

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Ana Vuković

**SPOLNO-SPECIFIČNI OKSIDACIJSKI I ANTIOKSIDACIJSKI STATUS JETRE
ŠTAKORA IZLOŽENIH KRONIČNOM I AKUTNOM STRESU**

Diplomski rad

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Diplomski rad
Odjel za biologiju
Diplomski znanstveni studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

SPOLNO-SPECIFIČNI OKSIDACIJSKI I ANTIOKSIDACIJSKI STATUS JETRE ŠTAKORA IZLOŽENIH AKUTNOM I KRONIČNOM STRESU

Ana Vuković

Rad je izrađen: Laboratorij za biokemiju, Odjel za biologiju, Osijek
Mentor: dr. sc. Elizabeta Has-Schön, redoviti profesor
Neposredni voditelj: dr. sc. Rosemary Vuković

Akutni i kronični stres mogu potaknuti proizvodnju reaktivnih kisikovih jedinki koje mogu uzrokovati oksidacijski stres, proces koji se smatra ključnim u razvoju brojnih bolesti, između ostalog i jetrenih. Cilj ovog istraživanja je bio odrediti utjecaj akutnog i kroničnog stresa na razvoj oksidacijskog stresa i antioksidacijski odgovor jetre kod mužjaka (M), neovarijektomiranih (NE-OVX) i ovarijektomiranih (OVX) ženki. Sedamdeset štakora 16 tjedana starosti bili su podijeljeni u 9 skupina: M, NE-OVX i OVX ženke kao kontrolne skupine; M, NE-OVX i OVX ženke izloženi akutnom stresu; mužjaci NE-OVX i OVX ženke izloženi kroničnom stresu. Kao indikator oksidacijskog oštećenja jetre praćena je razina lipidne peroksidacije koja je određena mjerenjem količine reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS). Antioksidacijski status jetre je istražen mjerenjem aktivnosti katalaze, superoksid-dismutaze, glutation-peroksidaze, glutation S-transferaze i glutation-reduktaze te omjera reduciranog i oksidiranog glutationa (GSH/GSSG). I akutni i kronični stres su uzrokovali povećanje količine TBARS-a kod svih skupina u odnosu na kontrolu. Rezultati pokazuju da izloženost akutnom i kroničnom stresu rezultiraju smanjenom antioksidacijskom obranom jer je u pojedinim skupinama smanjen omjer GSH/GSSG kao i aktivnost antioksidacijskih enzima. Ovarijektomija sama po sebi uzrokuje nastanak oksidacijskog stresa. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da akutni i kronični stres uzrokuju oksidacijski stres i smanjenje antioksidacijske zaštite u jetri. Također, antioksidacijski odgovor je i djelomično spolno specifičan, a razina oksidacijskog oštećenja je bila najveća kod OVX skupine.

Broj stranica: 65
Broj slika: 11
Broj tablica: 1
Broj literaturnih navoda: 152
Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: akutni stres, antioksidacijski enzimi, jetra, kronični stres, lipidna peroksidacija, oksidacijski stres, omjer GSH/GSSG, ovarijektomija, štakori

Datum obrane: 9.9.2016.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. *Sandra Ečimović*, docent
2. dr. sc. *Elizabeta Has-Schön*, redoviti profesor
3. dr. sc. *Ivna Štolfa Čamagajevac*, docent

Rad je pohranjen u: u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
MS thesis
Department of Biology
Graduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

SEX-SPECIFIC OXIDATIVE AND ANTIOXIDATIVE STATUS IN THE LIVER OF THE CHRONICALLY AND ACUTELY STRESSED RATS

Ana Vuković

Thesis performed at Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, Osijek
Supervisor: Ph. D. Elizabeta Has-Schön, Full Professor
Assistant in charge: Ph. D. Rosemary Vuković

Acute and chronic stress can induce production of reactive oxygen species that can cause oxidative stress, which is recognized to be one of the key pathophysiological mechanism in liver and other diseases development. The aim of this study was to estimate the impact of acute and chronic stress on the oxidative stress development and antioxidative status of the liver in males (M), non-ovariectomized (NE-OVX) and ovariectomized (OVX) female rats. Seventy 16-week-old rats were included in the study and divided into nine groups: M, NE-OVX and OVX females that were exposed to acute stress; M, NE-OVX, and OVX females that were exposed to chronic stress; and M and NE-OVX females as a control groups. As an indicator of liver oxidative damage, lipid peroxidation levels expressed in terms of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined, while liver antioxidative status was determined by catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase activities and oxidized/reduced glutathione (GSH/GSSG) ratio. Both acute and chronic stress significantly increased TBARS content in the liver of all groups relative to control groups. Results showed that acute and chronic stress lowered antioxidant defense capacity, as evaluated by the significant decrease in the GSH/GSSG ratio of some groups and decrease of some antioxidative enzymes activities. Ovariectomy itself resulted in the oxidative stress development. The analyzed data indicate that acute and chronic stress induced oxidative stress and decreased antioxidative capacity in rat liver. The oxidative and antioxidative response to acute and chronic stress were partially sex specific, while the intensity of the oxidative stress was the highest in the OVX females.

Number of pages: 65

Number of figures: 11

Number of tables: 1

Number of references: 152

Original in: Croatian

Key words: acute stress, antioxidative enzymes, chronic stress, GSH/GSSG ratio, lipid peroxidation, liver, ovariectomy oxidative stress, rats

Date of the thesis defence: 9.9.2016.

Reviewers:

1. Ph. D. *Sandra Ečimović*, Assistant Professor
2. Ph. D. *Elizabeta Has-Schön*, Full Professor
3. Ph. D. *Ivna Štolfa Čamagajevac*, Assistant Professor

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek

Zahvala

Ovom prilikom želim zahvaliti mentorici prof.dr.sc Elizabeti Has-Schön na stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Veliko hvala od srca svim mojim kolegama i prijateljima s kojima sam dijelila klupu, bilješke, probleme, smijeh i što smo zajedno 'udarili temelje' nečeg još boljeg, većeg. Hvala im na prijateljstvu, podršci i ljubavi.

... posebno hvala Branki i Zorici na pomoći u eksperimentalnom radu.

Neizmjereno sam zahvalna svojoj obitelji bez čije ljubavi, podrške i pomoći ne bi ni bilo ovog rada.

. . . veliko hvala braći Josipu i Adamu te sestri Rosemary koji su mi bili veliki oslonac, ali i ne prestaju biti. Posebno hvala sestri, ujedno i neposrednoj voditeljici, na pomoći i korisnim savjetima u eksperimentalnom radu i pisanju ovog rada, na usmjeravanju, podršci, ohrabrivanju, konstruktivnim prepirkama, razumijevanju, ljubavi...

. . . hvala mojim nećacima Noi i Lani na razumijevanju prilikom pisanja rada jer je igra najviše ispaštala.

. . . jedno posebno veliko hvala dragoj mami i tati na bezuvjetnoj ljubavi, podršci, a najviše na svim odricanjima te na cjelokupnom trudu koji su nesebično uložili u moje obrazovanje.

Od srca VELIKO HVALA!

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Akutni i kronični stres	1
1.2. Oksidacijski stres i njegovi pokazatelji	4
1.2.1. Lipidna peroksidacija kao pokazatelj oksidacijskog stresa	5
1.2.2. Pokazatelji antioksidacijskog statusa	6
1.2.2.1. Glutation - neenzimski pokazatelj antioksidacijskog statusa	6
1.2.2.2. Antioksidacijski enzimi kao pokazatelji antioksidacijskog statusa	7
1.3. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na biomarkere oksidacijskog stresa	8
1.4. Oksidacijski stres - rizik za razvoj patoloških stanja	9
1.5. Uzrok i posljedice oksidacijskog stresa u jetri	10
1.6. Stres i spolni hormoni	13
1.7. Ciljevi	15
2. MATERIJALI I METODE	16
2.1. Pokusne životinje	16
2.2. Ovarijsktomija	16
2.3. Protokol akutnog stresa	18
2.4. Protokol kroničnog stresa	18
2.5. Kontrolne skupine životinja	20
2.6. Laboratorijska analiza uzoraka	21
2.6.1. Priprema ekstrakta za mjerenje produkata lipidne peroksidacije	21
2.6.2. Određivanje količine reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline	21
2.6.3. Određivanje omjera koncentracija reduciranog i oksidiranog glutathiona	22
2.6.4. Priprema enzimskih ekstrakata za određivanje aktivnosti katalaze i glutathion S-transferaze	23
2.6.5. Određivanje aktivnosti katalaze	23
2.6.6. Određivanje aktivnosti glutathion S-transferaze	24
2.6.7. Priprema enzimskih ekstrakata za određivanje aktivnosti SOD, GR i GPx	24
2.6.8. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze	24
2.6.9. Određivanje aktivnosti glutathion-reduktaze	25
2.6.10. Određivanje aktivnosti glutathion-peroksidaze	26

2.6.11. Određivanje koncentracije proteina	26
2.7. Statistička obrada podataka	26
3. REZULTATI	28
3.1. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na razinu lipidne peroksidacije u jetri štakora.....	28
3.2. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na omjer koncentracija reduciranog i oksidiranog glutationa	30
3.3. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost katalaze u jetri štakora.....	32
3.4. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost glutathion S-transferaze u jetri štakora .	34
3.5. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost superoksid-dismutaze u jetri štakora.	36
3.6. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost glutathion-reduktaze u jetri štakora.....	38
3.7. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost glutathion-peroksidaze u jetri štakora .	40
4. RASPRAVA	42
5. ZAKLJUČAK.....	49
6. LITERATURA	50

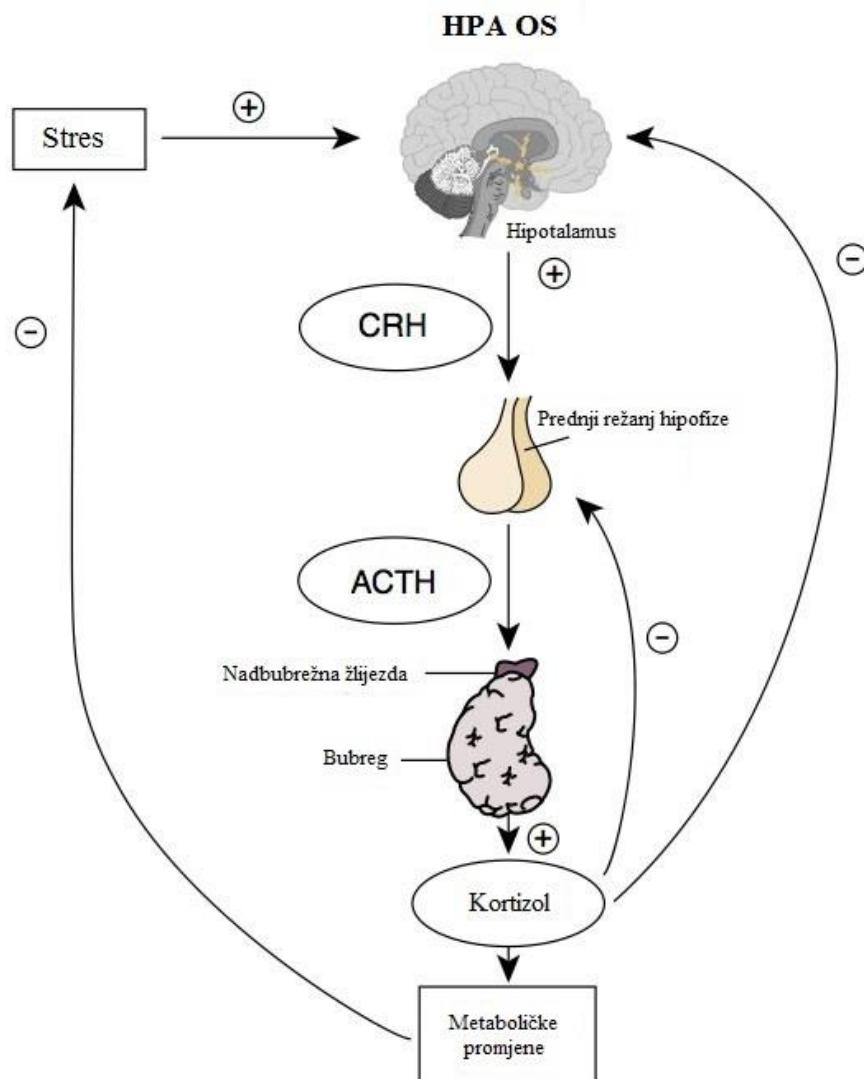
1. UVOD

1.1. Akutni i kronični stres

Živi organizmi su oduvijek bili izloženi različitim stresorima, unutarnjim ili vanjskim, te su na iste reagirali i davali adekvatan odgovor, a sve u cilju održavanja homeostaze. Sama homeostaza regulirana je kompleksom endokrinih procesa koje uključuju hipotalamičko-pituitarno-adrenalnu os (HPA) i simpatički autonomni sustav (Chrousos, 1992).

Stres izazvan bilo kojim stimulusom je stanje koje prijeti homeostazi. Stresor može biti psihološki, okolišni i fiziološki, a sposobnost nekog organizma da se 'nosi' s takvim stresorima odlučujući je korak u održavanju zdravlja i nastanka bolesti. Odgovor na stres je reguliran interakcijom fizioloških i neurokemijskih čimbenika (Nadeem i sur., 2006; Chakraboti i sur., 2008).

Središnji kontrolni centri koji sudjeluju u odgovoru na stres nalaze se u hipotalamusu i moždanom deblu, a to su kortikotropin-oslobađajući hormon (CRH) i neuroni koji proizvode arginin-vazopresin (AVP) (Chrousos, 1992). Hipotalamus kontrolira otpuštanje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) iz prednjeg režnja hipofize, a ACTH stimulira otpuštanje glukokortikoida (GC) iz kore nadbubrežne žlijezde, tj. kortizola kod ljudi. CRH je glavni stimulus hipotalamusa koji djeluje na pituitarno-adrenalnu os (Vale i sur., 1981), dok su AVP neuroni izuzetno značajni jer snažno sinergistički djeluju s CRH u svrhu poticanja otpuštanja ACTH, a samostalno imaju malen utjecaj na njegovo lučenje (Lamberts i sur., 1984). Cirkulirajući ACTH ključni je regulator otpuštanja GC-a koji je konačni efektor HPA osi i sudjeluje u kontroli homeostaze cijelog organizma te u odgovoru organizma na stres. Štoviše, osim otpuštanja GC-a iz kore nadbubrežne žlijezde, drugi važan element odgovora na stres je simpatoadrenalna aktivacija koja rezultira otpuštanjem katekolamina (Kaplan i sur., 1991). Glukokortikoidi čine poveznicu između HPA osi i aktivacije simpatičkog sustava ponašajući se kao transkripcijski aktivator fenil-etanolamin N-metiltrasferaze koja sintetizira epinefrin (Ross i sur., 1990). Također, GC igraju ključnu ulogu u bazalnoj aktivnosti HPA osi i na završetak odgovora na stres djelujući povratno na hipotalamus i hipofizu (De Kloet, 1991) (Slika 1).



Slika 1. Aktivacija hipotalamičko-pituitarno-adrenalne (HPA) osi tijekom stresa. Hipotalamus prima informaciju ukoliko dođe do izlaganja stresu, zatim otpušta kortikotropin-oslobađajući hormon (CRH) koji krvotokom ide do pituitarne žlijezde koju potiče na otpuštanje adrenokortikotropnog hormona (ACTH). ACTH dalje potiče nadbubrežne žlijezde na otpuštanje kortizola. Kortizol uzrokuje velik broj promjena u organizmu te može djelovati negativnom povratnom spregom na pituitarnu žlijezdu i hipotalamus (preuzeto i modificirano prema Spies i sur., 2014).

Ovisno o vrsti stresa, čimbenici kao što su AVP neuroni, angiotenzin II, različiti citokini i lipidni posrednici upale otpuštaju se i djeluju u određenoj mjeri na hipotalamičnu, pitutarnu i adrenalnu komponentu potencirajući njihovu aktivnost. U kojoj će mjeri djelovati na određenu komponentu, jasno je da ovisi o vrsti stresa (Phillips, 1987; Tsigos i Chrousos, 2002).

Ovisno o trajanju izloženosti organizma nekom stresoru, razlikuju se akutni i kronični stres. Akutni stres je stanje organizma koje nastaje kratkotrajnim, svakodnevnim izlaganjima nekom stresoru te najčešće nije opasan. Kod akutnog stresa dolazi do reakcije „borba ili bijeg“ (engl. *fight or flight*) prilikom koje usklađeno djeluju centralni živčani sustav (CŽS) i periferna tkiva. Kada se životinja ili čovjek trenutno nađu pred nekim novim izazovom ili opasnošću, CŽS odmah obradi informaciju iz okoliša i adekvatno odgovara na istu. Tom prilikom dolazi do akutnog, vremenski ograničenog pobuđivanja živčanih puteva odgovornih za budnost, uzbuđenje i fokusiranu pažnju. Istovremeno se inhibiraju živčani putevi koji služe akutno neadaptivnim funkcijama kao što su rast i reprodukcija. Promjene koje se događaju tijekom akutnog stresa, a koje nastaju kao odgovor CŽS, vode prema većoj opskrbi kisikom i hranjivim tvarima organa kao što su srce, mozak i skeletni mišići jer se smatra da oni imaju ključnu ulogu u koordinaciji odgovora na akutni stres (Chrousos, 2009). Tijekom akutnog stresa, raste krvni tlak u arterijama i broj otkucaja srca, dok su glukoneogeneza, glikogenoliza, lipoliza i sekrecija glukoze iz jetre stimulirane, a sve to zbog povišene razine katekolamina i kortizola (Chrousos i Gold, 1992). Putem svojih posrednika, stres može uzrokovati patološka, fizička i mentalna stanja kod pojedinaca. Što se tiče akutnog stresa kod ljudi, on najčešće potiče razvoj alergijskih bolesti (astma, ekcemi, urtikarija), migrena, glavobolja, gastrointestinalnih poremećaja, ali može biti popraćen i napadima panike te psihozom (Chrousos, 2009).

U odnosu na akutni, kronični stres je dugotrajnijeg karaktera, tj. u situacijama kroničnog stresa, stresor je prisutan dulji vremenski period i cijelo to vrijeme utječe na organizam. Kao i kod akutnog stresa, slijedi aktivacija HPA osi i simpatičkog sustava te kao krajnji rezultat slijedi otpuštanje kortizola. Prema nekim teorijama, razliku odgovora na akutni i kronični stres te njihove posljedice za organizam čini upravo kortizol. Kortizol ima ključnu ulogu u CŽS gdje je uključen u procese učenja i pamćenja, zatim u metabolizmu općenito gdje regulira korištenje i pohranjivanje glukoze, te u imunološkom sustavu gdje regulira jačinu i trajanje odgovora na upalni proces i sazrijevanje limfocita (Sapolsky i sur., 2000). Upravo zbog tih uloga kortizola proizlazi teorija njegove važnosti kod nastanka brojnih

patoloških stanja uslijed izloženosti kroničnom stresu. Kako na tu temu postoji dosta istraživanja i dosta različitih rezultata, pitanje kortizola u kroničnom stresu ostaje otvoreno. Naime, dio znanstvenika smatra da se koncentracija kortizola uslijed kroničnog stresa smanjuje (Bourne i sur., 1967), dok drugi dio smatra da se povećava (Arnetz i sur., 1987).

Govoreći o kroničnom stresu, često se spominje pojam 'alostaza' kojeg su definirali Sterling i Eyer (1988). Alostaza se definira kao postizanje stabilnosti putem stalnih promjena, a njezini primarni sustavi su spomenuti HPA os, citokini i kateholamini. Problem nastaje kada su ovi alostatički sustavi previše ili premalo aktivni. Takve česte promjene fizioloških procesa mogu postepeno iscrpljivati organe i tkiva organizma te ga dovode u stanje podložno bolestima, tj. dovode ga u stanje alostatskog opterećenja (McEwen i Stellar, 1993). Patološki odgovor najčešći je rezultat prekomjerne produkcije stresnih hormona ili nemogućnosti da se smanji aktivnost HPA osi (Gotovac i sur., 2009). Štoviše, mnoga istraživanja su i pokazala kako izlaganje kroničnom stresu može voditi do promjena u oksidacijskom statusu regija tijela važnih u odgovoru na stres, kao što su srčano-dišni, živčani i mišićni sustav, a tako i do brojnih patoloških stanja (Kaushik i Kaur, 2003).

Prethodno opisane fiziološke promjene koje se događaju prilikom akutnog, ali i kroničnog stresa, popraćene su promjenama u oksidacijsko/redukcijskom statusu stanica. Tako se patološka stanja uzrokovana nekim stresorom manifestiraju kroz povećanu proizvodnju oksidiranih molekula. Brojni su animalni modeli koji se kroz povijest koriste u svrhu istraživanja utjecaja akutnog ili kroničnog stresa, a jedan od najznačajnijih modelnih organizama su štakori. Također, brojne su i vrste stresa/stresora koji se koriste u svrhu izazivanja akutnog i kroničnog stresa. Prisilno plivanje, električni šokovi, stješnjavanje među cijevima, vježbanje i glasanje mačke samo su neki od njih.

1.2. Oksidacijski stres i njegovi pokazatelji

Oksidacijski stres je stanje u kojem oksidacijski procesi nadvladaju antioksidacijski kapacitet stanica i tkiva, jer dolazi do neravnoteže između prooksidansa i antioksidansa (Sies, 1997). Dakle, jedna od najznačajnijih pojava prilikom djelovanja stresora na organizam je proizvodnja reaktivnih kisikovih jedinki (engl. *reactive oxygen species*, ROS). ROS se u stanicama svakodnevno stvara prilikom odvijanja biokemijskih i fizioloških reakcija. U stanicama živih organizama ROS ima dvojak učinak: u niskim koncentracijama ima pozitivan učinak jer sudjeluje u međustaničnom signaliziranju i obrani protiv patogena, a visoke

koncentracije ROS-a uzrokuju oštećenje stanica putem oksidacijske modifikacije proteina, lipida i DNA (Elahi i sur., 2009). Dakle, prilikom prekomjerne proizvodnje takvih jedinki ili narušavanjem antioksidacijskog sustava, javlja se stanje oksidacijskog stresa (Betteridge 2000).

ROS su kemijski reaktivne molekule izvedene od kisika, niske molekularne mase, i najčešće imaju najmanje jedan nesparen elektron. U ROS se ubrajaju superoksidni anionski radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (HO^{\bullet}), vodikov peroksid (H_2O_2) i dr., a međusobno se razlikuju u reaktivnosti i toksičnosti (Poon i sur. 2004). Upravo zbog tih svojstava, ROS ima iznimno veliku sposobnost reagiranja s biološkim makromolekulama kao što su lipidi, proteini i DNA, a posebno jak oksidans je hidroksilni radikal (Gutteridge i Halliwell 1990). U ljudskom tijelu, ROS se stvara u normalnim fiziološkim i patološkim uvjetima u citosolu, mitohondrijima, lizosomima, peroksisomima i membranama (Hemmani i Parihar, 1998).

Kako bi spriječili prekomjerno nakupljanje ROS-a, nastanak oksidacijskog stresa te tako i brojna patološka stanja, živi organizmi su razvili endogene mehanizme kojima neutraliziraju bilo kakav porast oksidansa. Ravnotežu između proizvodnje i neutralizacije ROS-a održava antioksidacijski obrambeni sustav. Sustav uključuje antioksidacijske enzime kao što su katalaza (CAT), superoksid-dismutaza (SOD), glutation-peroksidaza (GPX), glutation-reduktaza (GR) i glutation S-trasferaza (GST) te neenzimske molekule koje uništavaju slobodne radikale kao što je glutation (Halliwell i Gutteridge, 1990). Iako organizmi posjeduju iste mehanizme obrane protiv ROS-a, odgovor na pojedine oksidanse nije isti jer je sposobnost neutraliziranja takvih jedinki tkivno-specifična (Stojiljković i sur., 2005) te ovisi o vrsti stresa (Sahin i Gumuslu, 2007). Također, mehanizam antioksidacijskog odgovora može imati jaku gensku osnovu (Costantini i sur., 2008).

1.2.1. Lipidna peroksidacija kao pokazatelj oksidacijskog stresa

Lipidna peroksidacija (LPO) je složena lančana reakcija razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acid*, PUFA) koja može biti potaknuta reaktivnim dušikovim jedinkama i ROS-om (Svingen i sur., 1978), a najčešće je to hidroksilni radikal. Proces LPO karakteriziraju tri stupnja, a to su inicijacija, propagacija i terminacija. Na svaku od tih faza može se utjecati različitim čimbenicima kao što su struktura lipida, te prisutnost oksidansa i antioksidansa. Rani produkti peroksidacije su lipidni hidroperoksidi, mono *trans*-konjugirani dieni, koji se razgrađuju najčešće u prisustvu

metalnih iona do aldehida kao konačnih produkata pomoću kojih se može utvrditi stanje oksidacijskog stresa (Esterbauer i sur., 1989; Yeo i sur., 1999). Peroksilni radikal, primarni slobodni radikal koji nastaje i intermedijer LPO, je taj koji reagira sa sljedećim membranskim lipidom i pretvara ga u slobodni radikal te započinje lančanu reakciju. Taj radikal može uzrokovati velike štete na molekulama DNA i jedan je od mutagenih komponenti oksidacijskog stresa. Peroksilni radikal također može formirati aldehide kao krajnje produkte LPO, a jedan od takvih je malonildialdehid (MDA). Promjene u strukturi membrana koje nastaju uslijed LPO mijenjaju fluidnost membrana i tako utječu na njihovu funkciju kao što su transport iona, odnos receptor/ligand, kao i na signalizaciju te utječu na osmotski gradijent (Webb i sur., 2008). Povećanje razine MDA, tj. povećanje LPO, najčešći je pokazatelj oksidacijskog stresa te oksidacijskog oštećenja tkiva.

1.2.2. Pokazatelji antioksidacijskog statusa

1.2.2.1. Glutation - neenzimski pokazatelj antioksidacijskog statusa

Glutation (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicin, GSH) je tripeptid niske molekularne mase u stanicama sisavaca gdje igra glavnu ulogu u obrani od oksidacijskog stresa i reaktivnih elektrofila (Griffith i Mulcahy, 1999; Meister i Anderson, 1983). GSH ima sposobnost brzog neenzimskog reagiranja s hidroksilnim radikalima, citotoksičnim produktima Fentonove reakcije, peroksinitritima, citotoksičnim produktima koji se formiraju u reakciji dušikovog monoksida s O_2 i $O_2^{\cdot -}$ (Kalyanaraman i sur., 1996; Luperchio i sur., 1996). U reakcijama koje katalizira glutation-peroksidaza, GSH sudjeluje i u reduktivnoj detoksikaciji H_2O_2 i lipidnih peroksida. GSH ima važnu ulogu u redukciji disulfidnih mostova i održavanju proteina u odgovarajućem oksidiranom, odnosno reduciranom stanju (Kaplowitz i sur., 1985). Štoviše, GSH sudjeluje i u održavanju drugih antioksidansa, kao što su askorbat i α -tokoferol, u reduciranom stanju. Svaka od navedenih reakcija direktno ili indirektno vodi ka nastajanju glutation disulfida (GSSG), tj. vodi do oksidacije GSH (Kehrer i Lund, 1994; Ursini i sur., 1995). GSSG se može povratno reducirati do GSH uz pomoć enzima glutation-reduktaze koristeći NADPH kao elektron donor. Omjer GSH i GSSG u stanicama koristi se kao marker oksidacijskog stresa (Zitka i sur., 2012). GSH se sintetizira se u citoplazmi hepatocita i zatim se dalje prenosi u druge organe (Ghizoni i sur., 2006).

1.2.2.2. Antioksidacijski enzimi kao pokazatelji antioksidacijskog statusa

CAT (EC 1.11.1.6) je tetramerni enzim koji se sastoji od jednakih podjedinica, veličine od 60 kDa. Svaka podjedinica u aktivnom centru ima skupinu hem i NADPH. Enzim je najvećim dijelom prisutan u peroksisomima stanica sisavaca gdje katalizira razgradnju H_2O_2 u vodu i molekularni kisik. Kako postoje dvije enzimске aktivnosti CAT koje ovise o koncentraciji H_2O_2 , navedena razgradnja je jedna od njih i događa se kada je koncentracija H_2O_2 visoka. Kada je koncentracija H_2O_2 niska i kada je prisutan odgovarajući donor vodika kao što je etanol, metanol ili fenol, CAT uklanja H_2O_2 , ali oksidirajući svoj supstrat (Aebi, 1974; Scibior i Cieczot, 2006).

SOD (EC 1.15.1.1) je jedan od prvih otkrivenih enzima koji je uključen u antioksidacijsku obranu, a otkrili su ga McCord i Fridovich 1969. godine. Pripada skupini oksidoreduktaza, a predstavlja glavnu staničnu obranu od $O_2^{\bullet-}$ jer katalizira njegovu dismutaciju u kisik i H_2O_2 . Radi se zapravo o skupini enzima SOD, a kod sisavaca se razlikuju tri izooblika, ovisno o metalnom ionu kojeg sadrže: SOD1 (CuZnSOD), SOD2 (MnSOD) i SOD3 (EC-SOD) (Yamakura i Kawasaki, 2010; Zelko i sur., 2002). SOD1 je homodimerni i glavni unutarstanični enzim iz skupine SOD, a nalazi se u citosolu i međumembranskom prostoru mitohondrija, ali pronađen je i u peroksisomima, lizosomima te jezgri (Crapo i sur., 1992; Okado-Matsumoto i Fridovich, 2001). SOD2 je homotetramerni enzim koji se nalazi u mitohondrijskom matriksu, dok je SOD3 izvanstanični homotetramer (Marklund, 1984; Weisiger i Fridovich, 1973).

GST (EC 2.5.1.18) su velika skupina enzima koja sudjeluje u fazi II detoksikacije. GST katalizira konjugaciju GSH s velikim brojem egzogenih i endogenih elektrofilnih čestica, pa tako i s ROS-om čime se smanjuje njihova toksičnost. Transferaze su podijeljene u dvije različite skupine: membranski vezane mikrosomalne i citosolne transferaze. Mikrosomalni GST ima važnu ulogu u endogenom metabolizmu prostaglandina. Citosolni GST je posebno značajan u ljudskoj populaciji jer ima dosta izražen polimorfizam te je podijeljen u 6 klasa koje se razlikuju po funkciji: alfa (α), mi (μ), omega (Ω), pi (π), teta (Θ), zeta (ζ) (Townsend i Tew, 2003). GST ima važnu ulogu u zaštiti tkiva od oksidacijskih oštećenja i aktivnost ovog enzima može odražavati antioksidacijski kapacitet tijela (Habig i Jakoby, 1981).

GR (EC 1.6.4.2) katalizira reakciju redukcije GSSG do GSH. NADPH, koji je potreban za tu redukciju, osigurava se pentoza-fosfatnim putem (Nelson, 2008). GR je flavin adenin dinukleotid (FAD) vezujući homodimerni protein čija je svaka podjedinica izgrađena

od četiri definirane domene (Dym i Eisenberg, 2001). Dimerna struktura enzima je ključna za njegovu funkciju jer obje podjedinice sudjeluju u izgradnji aktivnog centra (Karplus i Schultz, 1989). Kako je GR presudni enzim kod održavanja visokog omjera GSH/GSSG i indikator je redoks stanja u stanicama, promjene u njegovoj aktivnosti mogu uvelike narušiti antioksidacijski kapacitet stanice.

GPx (EC 1.11.1.9) je zajedničko ime za grupu enzima s peroksidaznom aktivnošću koje koriste GSH u svojim reakcijama. Peroksidaze imaju sposobnost redukcije H_2O_2 i lipidnih hidroperoksida do vode i odgovarajućih alkohola. Poznato je osam izoformi GPx-a koje su supstratno specifične, a razlikuju se po staničnoj lokalizaciji i genu koji ih kodira. Četiri izoforme su selen-ovisne (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4), a ostale četiri su neovisne o selenu (GPx5, GPx6, GPx7 i GPx8) (Papp i sur., 2007). Kako se GPx izoforme razlikuju po lokalizaciji u stanici, imaju i različitu antioksidacijsku ulogu. GPx1, GPx2 i GPx3 su homotetrameri, dok je GPx4 monomer koji je manje molekulske veličine od podjedinica ostalih peroksidaza. Upravo zahvaljujući maloj veličini, ali i hidrofobnoj površini, GPx4 ima sposobnost reagirati s membranskim lipidima (Brigellius-Flohe, 2006). Ono što čini bitnu fiziološku razliku između dvije skupine peroksidaza je ta što peroksidaze ovisne o selenu mogu reducirati i organske i neorganske supstrate, a one neovisne o selenu samo organske (Chambers i sur., 1986; Perry i sur. 1999). Također, važno je naglasiti da je GPx1 najzastupljenija izoforma peroksidaza koja se nalazi u citosolu i mitohondrijima, a velike količine su pronađene u organima kao što je jetra gdje je velika proizvodnja peroksida (Brigellius-Flohe i Maiorino, 2013).

1.3. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na biomarkere oksidacijskog stresa

Liu i suradnici (2000) prikazali su kakav utjecaj imaju akutno i kronično vježbanje na pokazatelje oksidacijskog stresa u različitim tkivima (mišići, jetra, srce, mozak). Utvrdili su da razlike u biomarkerima postoje, ovisno o tome radi li se o akutnom ili kroničnom vježbanju te ovisno o vrsti tkiva. Pojedini biomarkeri, kao što je koncentracija malondialdehida (MDA), pokazali su da je u ovom slučaju učinak akutnog stresa veći nego kronični, no da se njegova koncentracija pri akutnom stresu povećala samo u jetri. Tek kod izlaganja kroničnom vježbanju, koncentracija MDA se povećala i u drugim tkivima, osim u mozgu. Naprotiv, koncentracija MDA u moždanom tkivu se znatno smanjila te se iz toga može zaključiti kako kronični stres u ovom slučaju ima pozitivni učinak. U slučaju akutnog i kroničnog izlaganja

fizičkom naporu nije zabilježen značajniji porast karbonilnih proteina pa bi se moglo reći kako vrsta, tj. uzrok stresa u nekoj mjeri ima utjecaj na koncentraciju karbonilnih proteina. Possamai i suradnici (2007) su štakore izlagali malationu, akutno i sub-kronično, te uz visok porast LPO, zabilježili i značajniji porast karbonilnih proteina. U primjerima istovremenog izlaganja štakora fizičkom naporu te malationu, iznimno je velik porast LPO što samo potvrđuje činjenicu kako je LPO najučestaliji dokaz oksidacijskog oštećenja (Halliwell 1989). Osim navedenih parametara oksidacijskog oštećenja koji se prate, važni biomarkeri su i endogeni antioksidansi. Tu također postoje velike razlike ovisno o vrstama tkiva jer sva tkiva nemaju jednak endogeni antioksidacijski status. Utjecaj akutne i kronične fizičke aktivnosti također se prati mjerenjem koncentracije askorbinske kiseline, GSH i alfa-tokoferola u različitim tkivima. U moždanom tkivu, koje pri kroničnom stresu bilježi pad MDA, raste i koncentracija askorbinske kiseline te ostalih neenzimskih i enzimskih antioksidansa. Mozak, koji inače slabo podliježe oksidacijskim oštećenjima, uobičajeno ima vrlo nisku koncentraciju antioksidacijskih enzima i GSH (Halliwell 1992).

1.4. Oksidacijski stres - rizik za razvoj patoloških stanja

Narušena oksidacijsko-antioksidacijska ravnoteža predstavlja veliki rizik za razvoj raznih patoloških stanja kao što su Alzheimerova bolest, osteoporoza, Parkinsonova bolest, dijabetes, kardiovaskularne bolesti i brojne druge.

Kada se govori o oksidacijskom stresu te kakve posljedice može izazvati izlaganje stresu, posljednja dva desetljeća dosta se važnosti pridaje kardiovaskularnim bolestima. S druge strane, kardiovaskularne bolesti su snažno povezane s pretilošću. U oba poremećaja oksidacijski stres ima važnu ulogu, a zabilježeno je da pretilost može inducirati sistemski oksidacijski stres. Brojni animalni modeli na kojima su rađena istraživanja potvrđuju da je ROS, akumulacijom produkata LPO, odgovoran za nastajanje ateroskleroze i ostalih kardiovaskularnih bolesti (Liao i sur. 1994).

U kardiovaskularnim bolestima postoji nekoliko potencijalnih izvora produkcije ROS-a, a oni uključuju ksantin-oksidadu, ciklooksigenazu, lipooksigenazu, respiracijski lanac, citokrom P450 i NAD(P)H-oksidadu. Brojna istraživanja pokazuju da različite fiziološke tvari koje se javljaju tijekom patogeneze vaskularnih bolesti mogu inducirati nastanak ROS-a. Primjerice, vazoaktivne tvari kao što su angiotenzin-II, endotelin-1 i trombin aktiviraju

NAD(P)H-oksidadazu. Citokini (IL-1 β , TNF- α) i faktori rasta mogu regulirati i/ili aktivirati NAD(P)H-oksidadazu (Taniyama i sur. 2003).

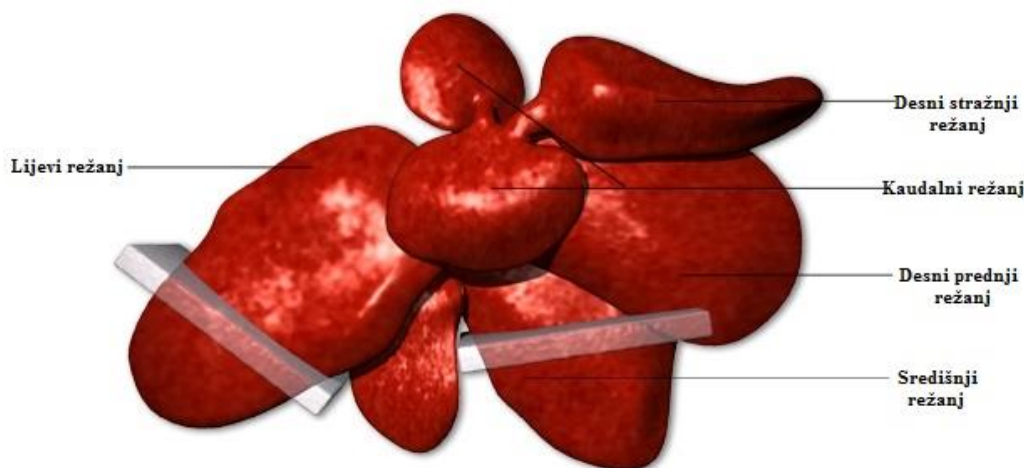
Aktualni problem u svijetu povezan s kardiovaskularnim bolestima je pretilost. Kod životinjskih organizama pretilost može biti izazvana promjenama u neuroendokrinom sustavu, u prehrani ili genskim promjenama (Diemen i sur. 2006). Ako se govori o prehrani kao o uzroku pretilosti povezano s pojavom oksidacijskog stresa, u ovu svrhu značajna su istraživanja napravljena na štakorima. Naime, postoje mnogobrojna istraživanja koja su obuhvaćala kratkotrajnije ili dugotrajnije izlaganje štakora prehrani s visokim udjelom masti kako bi se pratile promjene biomarkera oksidacijskog stresa. Pretilost uzrokovana visokim udjelom masnih kiselina u prehrani gotovo uvijek je popraćena porastom oksidacijskog stresa u jetrenom tkivu. To je karakterizirano smanjenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima i koncentracije GSH što, s druge strane, korelira s porastom MDA i karbonilnih proteina u većini tkiva. Sve ove promjene mogu voditi daljnjoj progresiji pretilosti i stanja povezanih sa pretilošću (Noeman i sur. 2011).

Dobro je poznato da oksidacijski stres ima važnu ulogu i u procesu starenja uzrokujući oštećenja mitohondrijske DNA (Finkel i Holbrook, 2000). Starenje je proces progresivnih oksidacijskih promjena koje se događaju s vremenom, a povezane su sa smanjenjem antioksidacijske obrane i povećanjem sadržaja produkata oksidacije biološki važnih molekula. Menopauza je također prirodno stanje starenja koje se može postići i odstranjenjem jajnika (Shuster i sur., 2008). Menopauza i postmenopauzalni period se kod žena dosta često dovode u vezu s pojavom različitih bolesti jer dolazi do velikih hormonalnih promjena. Naime, manjak estrogena koji se javlja tijekom menopauze uzrokuje niz metaboličkih promjena i nastanak oksidacijskog stresa (Kankofer i sur., 1997). Za usporedbu, kardiovaskularne bolesti su učestalije kod muškaraca nego kod žena prije menopauze, dok je od nastupanja menopauze situacija obratna (Wenger i sur., 1993). Osim kardiovaskularnih bolesti, postoji sve veći broj dokaza da se kod postmenopauzalnih žena sve češće javlja i osteoporoza (Muthusami i sur., 2005; Riggs i sur., 2002).

1.5. Uzrok i posljedice oksidacijskog stresa u jetri

Jetra je izuzetno heterogen organ čije su temeljne funkcionalne jedinice režnjevi ili lobuli. Miševi i štakori imaju po 4 režnja: središnji, lijevi, desni i kaudalni, od kojih su svaki, osim lijevog, još podijeljeni u 2 ili više dijelova (Martins i Neuhaus, 2007; Slika 2). Ljudska

jetra je prema većini autora također podijeljena na četiri režnja: desni, lijevi, kvadratni i repasti iako ih pojedini autori drugačije imenuju (Kogure i sur., 1999).



Slika 2. Jetra štakora (preuzeto i modificirano s: Web 1)

Kako je jetra glavni metabolički organ tijela, ima strateški položaj u krvotoku. Portalna vena i jetrena arterija čine dva glavna vaskularna sustava koja opskrbljuju jetru krvlju. Oko 70% krvi u jetru ulazi putem portalne vene koja je bogata hranjivim sastojcima apsorbiranim u tankom crijevu, a 30% putem arterije. S druge strane, portalna vena opskrbi jetru s 40% kisika, a arterija sa 60% (Burt i Day, 2002).

Smatra se da jetru izgrađuje najmanje 15 različitih vrsta stanica, od kojih su najznačajnije hepatociti (parenhimske ili jetrene stanice), endotelne stanice, Kupfferove stanice i jetrene zvjezdaste stanice (Burt i Day, 2002). Najbrojnije stanice su hepatociti koji čine 60% svih stanica te 80% volumena jetre. Citoplazma hepatocita sadrži brojne mitohondrije, lizosome i peroksisome koji su bogati enzimima koji sudjeluju u oksidaciji masnih kiselina, razgradnji purina i H_2O_2 . Hepatociti su stanice koje obavljaju brojne funkcije, a koje čine jetru središnjim metaboličkim organom. U njima se odvijaju procesi glukoneogeneze, neutralizacije otrovnih i štetnih spojeva, sinteza albumina i čimbenika zgrušavanja ovisnih o vitaminu K, odstranjenje produkata intermedijernog metabolizma (primjerice, bilirubina koji nastaje razgradnjom eritrocita i koji se putem žuči izlučuje u crijevo), spolnih hormona, skladištenje vitamina B12 i glikogena, metabolizam lijekova i

drugih egzogenih i endogenih tvari. U jetri se stvaraju i lipoproteini važni za metabolizam i prijenos masti u krv (Dunn i sur., 1989). Kupfferove stanice zauzimaju 15% sveukupnih stanica jetre, a razvijaju se od cirkulirajućih monocita. Ove stanice mogu lokalno proliferirati i postati fagociti, omogućavaju 'unakrsnu komunikaciju' s ostalim stanicama te su glavni proizvođači citokina kao medijatora upalnog procesa (Wu i Cederbaum, 2009). Jetrene zvjezdaste stanice nisu mnogobrojne, ali imaju izuzetno veliki značaj. One čine oko 5% sveukupnih stanica jetre, a nekad su bile poznate samo kao stanice u kojima se pohranjuju masti. Sada je poznato da imaju važnu ulogu u regeneraciji i jetrenoj fibrogenezi te cirozi (Ratzliff i Friedman, 1997).

Strukturna i funkcionalna raznolikost jetre svrstava ju po složenosti odmah iza mozga. Zauzima središnje mjesto u metabolizmu jer vrši veliki broj vitalnih funkcija kao što je učinkovito preuzimanje aminokiselina, ugljikohidrata, kolesterola, proteina, lipida i vitamina u svrhu njihovog pohranjivanja i metaboliziranja te, u konačnici, njihovog otpuštanja u krv i/ili u žuč (Bloom i Fawcett, 1975).

Jetra je glavni organ kojeg napada ROS (Sánchez-Valle i sur., 2012). S oksidacijskim stresom u jetri se prvenstveno povezuju hepatociti, a glavni izvori ROS-a u njima su mitohondriji, peroksisomi i mikrosomi. Veliki dio ROS-a stvara se tijekom oksidacijske fosforilacije. Prilikom normalnih fizioloških uvjeta, 1 % elektronskog toka vodi prema nastajanju $O_2^{\cdot-}$, a enzimi koji sudjeluju u njegovu stvaranju su NADP(H) ili ksantin-oksidaza. Također, značajan izvor ROS-a u hepatocitima, ali i ostalim jetrenim stanicama, može biti endoplazmatski retikulum putem enzima citokroma P450. Stoga, Kupfferove i endotelne stanice su također izložene i osjetljive na molekule povezane s oksidacijskim stresom. Primjerice, Kupfferove stanice inducirane oksidacijskim stresom proizvode veliki broj citokina kao što je TNF (engl. *tumor necrosis factor*), a koji mogu pojačati upalni proces i uzrokovati apoptozu. Produkti LPO uzrokovane oksidacijskim stresom potiču proliferaciju i sintezu kolagena jetrenih zvjezdastih stanica (Cichoż-Lach i Michalak, 2014; Wu i Cederbaum, 2009). Dakle, kada počne prekomjerna sinteza ROS-a nastane stanje oksidacijskog stresa koje ima važnu ulogu u nastajanju brojnih jetrenih bolesti, ali i drugih kroničnih i degenerativnih poremećaja. Stres igra potencijalnu ulogu u težim bolestima jetre općenito, a posebno u upalama jetrenog tkiva (Lu i sur., 2003). Glavni učinak stresa na jetru povezan je s promjenama u jetrenom krvnom optoku s posljedicom vazospazma, centrilobularne hipoksije i konačnog oštećenja jetre (Kaplan i Wheeler, 1983). Oksidacijski stres uzrokuje jetrena oštećenja putem LPO, oštećenja proteina i DNA, ali i modulirajući

puteve koji kontroliraju normalne biološke funkcije. Kako se tu radi o narušavanju puteva koji reguliraju transkripciju gena, ekspresiju proteina, apoptozu stanica i aktivaciju jetrenih zvjezdastih stanica, jasno je da će doći do inicijacije i progresije brojnih patoloških stanja (Singal i sur., 2011). U posljednje vrijeme, oksidacijski stres je prepoznat kao fundamentalni čimbenik u patološkim promjenama koje se odvijaju pri bolestima kao što su alkoholna bolest jetre, nealkoholna masna bolest, jetrena encefalopatija te brojne druge (Cederbaum i sur., 2009; Ucar i sur., 2013). Štoviše, oksidacijski stres koji sustavno raste uslijed neke od jetrenih bolesti može uzrokovati oštećenja i drugih organa, kao što su bubrezi i mozak (Palma i sur., 2014). Bosoi i suradnici (2012) su istraživanjem pretpostavili da oksidacijski stres koji se javlja uslijed kronične jetrene bolesti djeluje kao okidač i da uzrokuje nastanak edema mozga.

Jetra, kao i druga tkiva i organi u organizmima, ima sposobnost štititi se od prekomjerne proizvodnje ROS-a i nastanka stanja oksidacijskog stresa. Za to posjeduje i enzimski i neenzimski antioksidacijski sustav, ali svakako treba napomenuti da posjeduje najveći antioksidacijski enzimski kapacitet u tijelu u skladu s njezinom središnjom metaboličkom funkcijom pohranjivanja glikogena, razaranja eritrocita, sinteze proteina, detoksikacije i brojnih drugih aktivnosti. Adaptivni odgovor jetre na neki stres pokreće povišena razina glukokortikoida u serumu (Navarro-Arevalo i Sanchez-Del Pino, 1998).

1.6. Stres i spolni hormoni

Kada se govori o održavanju homeostaze u živim organizmima, ne smije se izostaviti održavanje hormonalne ravnoteže za normalno funkcioniranje nekog živog organizma. U protivnome, može doći do značajnog narušavanja metaboličkih procesa (Kankofer i sur., 2007).

Iako je poznato da postoji značajna korelacija između stresa i spolnih hormona, točni mehanizmi kojima estrogen, testosteron i progesteron ostvaruju svoju zaštitnu ulogu u stresnim uvjetima nisu u potpunosti razjašnjeni. Reproductivni hormoni utječu na ishod stresa, a s druge strane hormoni koji inače sudjeluju u odgovoru na stres imaju utjecaj na reproduktivne hormone. U prilog tome govori činjenica da je tijekom kroničnog stresa, kada je koncentracija kortikosterona u estrus i diestrus fazi u porastu, potrebno tek nekoliko dana da se kod štakora promijeni estrusni ciklus (Chan i sur. 1976).

Progesteron je jedan od primarnih steroida sintetiziranih od kolesterola i prekursor je brojnih aktivnih steroidnih hormona u tkivima gdje nastaju, uključujući i kortikosteron iz kore

nadbubrežne žlijezde. Izlučivanje progesterona raste u odgovoru na različite stresore i evidentno modulira brojne funkcije u tijelu (Andersen i sur., 2004; Budec i sur., 2002; Valdez i sur 2012). Iako funkcija progesterona u odgovoru na stres nije u potpunosti razjašnjena, istraživanjem patoloških stanja poput Alzheimerove bolesti uloga progesterona postaje sve jasnija. Naime, progesteron kroz svoj neuroaktivni metabolit $3\alpha, 5\alpha$ - tetrahidroprogesteron ($3\alpha,5\alpha$ -THP) ili alopregnanolon povezan je u odgovoru na stres kao regulator jer smanjuje funkciju HPA osi inhibirajući receptore tipa A hipotalamične gama-aminomaslačne kiseline koji kontroliraju transkripciju i razinu peptida CRH (Brunton i sur., 2009; Frye, 2007). Kalil i suradnici (2013) istraživanjem su pokazali kako ovarijska ne utječe na progesteronski odgovor na stres, dokazujući kako su nadbubrežne žlijezde jedini izvor progesterona tijekom stresa kod ženki. Također je dokazano kako je progesteron u usporedbi s estradiolom ili estriolom manje djelotvoran na inhibiranje LPO. Slabija antioksidacijska svojstva progesterona javljaju se i u odgovoru na stres koji je izazvan metalom željezom u neuronima (Goodman i sur., 1996).

Testosteron je steroidni hormon koji sudjeluje u odgovoru na stres i kod mužjaka i kod ženki (Retana-Márqueza i sur., 2003; Hermansa i sur., 2007). Tijekom stresa, testosteron se ispoljava više kod mužjaka nego kod ženki, što se dovodi u vezu s agresivnim ponašanjem izazvanim stresom (Bergman i Brisman, 1994). Dosta je istraživana neuroprotektivna uloga testosterona, ali i drugih reproduktivnih hormona. Istraživanja su posebno obuhvaćala Alzheimerovu bolest, kao što je već spomenuto kod progesterona. Smatra se da se njegov antioksidacijski učinak ispoljava kroz regulaciju antioksidacijskih enzima SOD i CAT preko androgenih receptora, više nego preko konverzije u estrogen ili direktnim uništavanjem slobodnih radikala (Ahlbom i sur., 2001). Testosteron je uključen i u regulaciju GSH, što je dokazano njegovom povećanom koncentracijom u istraživanju homogenata štakorovog mozga (Atroshi i sur., 1990).

Kako je bilo pretpostavljeno da su oksidacijski i antioksidacijski procesi spolno specifični, detaljnija analiza pojedinih istraživanja i neka novija istraživanja pokazuju da su upravo za tu specifičnost najzaslužniji estrogeni (Marotti i sur., 2010; Šverko i sur., 2004; Fu i Hornick 1995). Estrogeni, koji su vrlo učinkoviti u borbi protiv slobodnih radikala, narušavaju lančanu reakciju slobodnih radikala koji nastaju oksidacijom membrana te na taj način inhibiraju oksidaciju lipida i proteina (Akçay i sur. 2000). Antioksidacijska svojstva estrogena najvjerojatnije su povezana s hidroksilnom skupinom prstena A koja se ponaša kao visokoučinkoviti elektron donor i 'sakupljač' slobodnih radikala. Također, pretpostavlja se da

estrogeni mogu djelovati i protiv metalnih iona na način da ih 'zarobe' ili mogu donirati proton kako bi reducirali peroksidne radikale (Prokai-Tatrai i sur. 2008). Kolika će biti antioksidacijska uloga estrogena, prvenstveno ovisi o hidrofilnoj ili lipofilnoj prirodi radikala te fenolnoj strukturi samog estrogena.

Kako je hormonalna neravnoteža uzrok brojnih patoloških stanja kod menopauzalnih i postmenopauzalnih žena, jasno je da se isti učinak može postići i uklanjanjem jajnika i smanjenjem produkcije njihovih hormona. Upravo se taj učinak postiže ovarijektomijom. Ovarijektomija je dosta raširen animalni model koji se koristi u svrhu istraživanja nedostatka estrogena i pratećih metaboličkih posljedica (Turner i sur., 2001). Manjak hormona proizvedenih od strane jajnika kod ovarijektomiranih eksperimentalnih životinja predstavlja značajan model za istraživanje i proučavanje fiziopatoloških posljedica menopauze kod žena (Muñoz-Castañeda i sur., 2006). Također, osim što pomaže razumijevanju patoloških stanja, ovaj model pomaže i eventualnom liječenju primjenjivanjem hormonskih/estrogenskih terapija. Primjerice, kod postmenopauzalnih žena koje imaju hiperkolesterolemiju, estrogenska terapija učinkovito smanjuje razinu ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola, a povećava razinu HDL-kolesterola (Walsh i sur., 1991). Ove terapije su sve raširenije, a ono što je bitno naglasiti je da se istraživanja jetre čine klinički najopravdanije pošto je jetra prvi metabolički cilj kod estrogenske terapije (Moreira i sur., 2007).

1.7. Ciljevi

1. Odrediti utjecaj akutnog stresa na oksidacijski i antioksidacijski odgovor jetre štakora
2. Odrediti utjecaj kroničnog stresa na oksidacijski i antioksidacijski odgovor jetre štakora
3. Odrediti utjecaj ovarijektomije na oksidacijski i antioksidacijski odgovor jetre štakora izloženih akutnom i kroničnom stresu
4. Ustanoviti postoje li razlike u oksidacijskom i antioksidacijskom odgovoru jetre štakora na akutni i kronični stres između mužjaka, neovarijektomiranih i ovarijektomiranih ženki

2. MATERIJALI I METODE

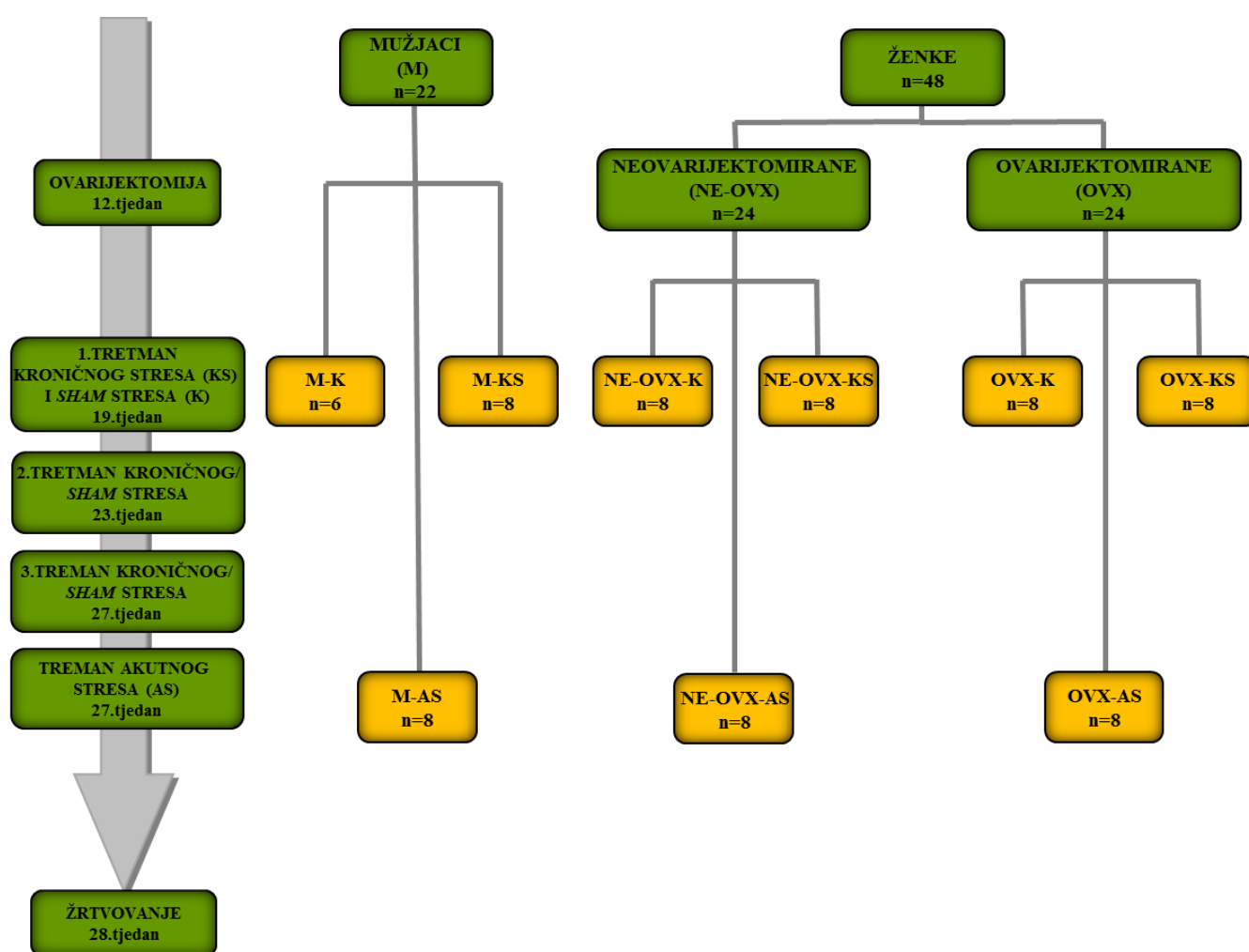
2.1. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na životinjama uzgojenim u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku uz odobrenje Etičkog povjerenstva Ministarstva poljoprivrede RH (br. odobrenja: 2158-61-07-11-519). Tijekom pokusa životinjama je rukovano prema Hrvatskom zakonu za zaštitu životinja. Istraživanje je provedeno na 70 štakora linije Sprague-Dawley starosti 16 tjedana (22 mužjaka, 48 ženki). Životinje su bile podijeljene u tri skupine: mužjaci (M), neovarijektomirane ženke (NE-OVX) i ovarijektomirane ženke (OVX). Svaka skupina je dalje bila podijeljena na tri podskupine: kontrolna skupina (K) koja je bila izložena lažnom (engl. *sham*) stresu, skupina podvrgnuta akutnom stresu (AS) i skupina podvrgnuta kroničnom stresu (KS). Svaka podskupina sastojala se od 8 štakora, osim kontrolne skupine mužjaka (M-K) koja je imala 6 jedinki (Slika 3). Životinje su bile smještene u standardnim kavezima na sobnoj temperaturi te su hranjene standardnom laboratorijskom hranom za štakore koja im je kao i vodovodna voda bila dostupna *ad libitum* (neograničeno), osim u slučaju kad je manjak hrane korišten kao stresni čimbenik.

2.2. Ovariiektomija

Ovariiektomija je provedena na ženkama štakora ($n=24$) u dobi od 12 tjedana prema protokolu Harlan laboratorija (Harlan HUS-QREC-PRD-932, izdanje: 01, revizija 03). Sve kirurške zahvate izvela je stručna osoba, isti dan na svim životinjama. Ženke su tijekom ovariiektomije bile anestetizirane izofluranom (Forane® isofluranum, Abbott Laboratories Ltd, Queenborough, UK). Anestetizirani je štakor bio položen u ventralni položaj s repom okrenutim prema stručnoj osobi koja je izvodila ovariiektomiju. Uslijedilo je uklanjanje dlačica s dorzalnog lumbalnog područja te je napravljen rez između kaudalnog kraja prsnog koša i baze repa. Potom je rez napravljen kroz mišić nakon čega su jajnici i dio jajovoda uklonjeni. Ostatak tkiva je vraćeno u peritonealnu šupljinu. Nakon operacije, štakori su dobili hranu i vodovodnu vodu *ad libitum* te su bili promatrani sljedeća 72 sata. Prethodno napravljena dva pilot istraživanja su pokazala kako je stres uzrokovan operacijom učinjenom 4 tjedna prije izlaganja protokolu stresa u potpunosti kompenziran i zanemariiv, te iz toga razloga nije bilo potrebno raditi lažne operacije na dodatnim skupinama životinja, čime je

smanjen broj žrtvovanih životinja. Pilot istraživanja su pokazala kako se ponašanje ovarijsktomiranih i neovarijsktomiranih ženki prilikom rukovanja prije protokola stresa međusobno ne razlikuje.



Slika 3. Shema tijeka eksperimenta.

2.3. Protokol akutnog stresa

Skupinama štakora koje su bile izložene djelovanju akutnog stresa (M-AS, NE-OVX-AS, OVX-AS), rukovano je na dnevnoj bazi prilikom čišćenja kaveza ili hranjenja dok nisu navršili 28. tjedan starosti. Akutni stres je izazvan stežnjavanjem u metalne cijevi pri +4 °C tijekom sat vremena. Navedeni tip stresa je odabran iz razloga što se pokazalo da izaziva snažan odgovor kod štakora (Glavin i sur., 1994). Neposredno nakon izlaganja akutnom stresu, životinje su anestetizirane kombinacijom ketamina (Ketanest, Pfizer Corporation, koncentracije 30 mg×kg⁻¹) intramuskularno i inhalacijom izoflurana (Forane® isofluranum, Abbott Laboratories Ltd) u staklenoj komori, nakon čega su žrtvovane. Lijevi režanj jetre (Slika 2) uzorkovan je i smrznut u tekućem dušiku te pohranjen na -80 °C do analize.

2.4. Protokol kroničnog stresa

U dobi od 16 tjedana, svi štakori su premješteni u eksperimentalni laboratorij. Dvadeset četiri jedinke (8 M, 8 NE-OVX, 8 OVX) u dobi od 19 tjedana bile su izložene kroničnom stresu (Tablica 1). Štakori su prošli kroz tri tretmana stresa, a svaki tretman je trajao 10 dana. Prvi tretman stresa se razlikovao od posljednja dva jer se u tome tretmanu izvodio GTT test. Tijekom drugog i trećeg tretmana, stresori su ponavljani istim redoslijedom i u isto vrijeme. Razlika između svakog tretmana stresa je bila 18 dana te je cijeli protokol završio kada su štakori dosegli starost od 28 tjedana. Stresorni čimbenici koji su korišteni u protokolu kroničnog stresa bili su: svjetlo upaljeno tijekom noći, 60 min rotacije kaveza, oduzimanje hrane tijekom noći (gladovanje), 60 min stežnjavanja u metalnim cijevima pri +4 °C, 3 min prisilnog plivanja, svjetlo upaljeno tijekom noći popraćeno nepravilnim zvukovima (alarm mobilnog telefona podešen u nepravilnim vremenskim intervalima), 2 sata izlaganja mačjem mirisu (Slika 4). Kao prirodni neprijatelj štakora, mačke su korištene u pokusu kao stresni čimbenik, te je izlaganje mačjem mirisu izazvalo trenutni i vrlo jaki stres kod štakora, što je bilo vidljivo iz nakostrješenosti njihovih dlaka. Tijekom protokola stresa, mačke su držane u odgovarajućim kavezima u prostoriji koja je s eksperimentalnim laboratorijem bila povezana vratima, tako su pokusne životinje bile izložene isključivo mirisu predatora. Prije samog pokusa, mačke je pregledao veterinar koji je potvrdio kako su mačke zdrave te da mogu sudjelovati u protokolu. Nakon završenog protokola kroničnog stresa životinje su anestetizirane kombinacijom ketamina (Ketanest, Pfizer Corporation, koncentracije 30 mg×kg⁻¹) intramuskularno i inhalacijom izoflurana (Forane® isofluranum, Abbott Laboratories Ltd) u

staklenoj komori, nakon čega su žrtvovane. Lijevi režanj jetre (Slika 2) uzorkovan je i smrznut u tekućem dušiku te pohranjen na -80 °C do analize.

Tablica 1. Protokol kroničnog stresa

1. Tretman stresa		2. i 3. Tretman stresa
Dan	Stresori	
1.	Gladovanje tijekom noći (18:00 -9:00)	Gladovanje tijekom noći (18:00-9:00)
2.	GTT test (mjerenje osnovice)	60 min stješnjavanja u metalne cijevi i gladovanje pri +4 °C
3.	60 min stješnjavanja u metalne cijevi i gladovanje pri +4 °C	Upaljeno svjetlo tijekom noći
4.	GTT test (referenca akutnog stresa)	60 min rotacije kaveza
5.	Upaljeno svjetlo tijekom noći	3 min prisilnog plivanja
6.	60 min rotacije kaveza	Upaljeno svjetlo tijekom noći popraćeno nepravilnim zvukovima
7.	3 min prisilnog plivanja	Izloženost mačjem mirisu i gladovanje
8.	Upaljeno svjetlo tijekom noći s neuobičajenim zvukovima	60 min stješnjavanja u metalne cijevi i gladovanje pri +4 °C
9.	Izloženost mačjem mirisu i gladovanje	3 min prisilnog plivanja
10.	GTT test (referenca kroničnog stresa)	GTT test (produžena referenca kroničnog stresa)



Slika 4. Oblici stresiranja štakora. A- stješnjavanje u metalnim cijevima; B- rotacija kaveza; C- prisilno plivanje (Fotografirala: Marta Balog)

2.5. Kontrolne skupine životinja

Kontrolne skupine životinja (M-K, OVX-K i NE-OVX-K) podvrgnute su lažnom (*sham*) stresu. Lažni stres podrazumijeva izlaganje životinja istim uvjetima kao i životinja izloženih kroničnom stresu, ali bez prisutnosti stresnog čimbenika. Primjer lažnog stres protokola: kada je kod kroničnog protokla stresa skupina životinja bila stješnjavana u metalnim cijevima 60 minuta na $+4^{\circ}\text{C}$, kontrolna skupina je bila smještena u isti okoliš, ali pri sobnoj temperaturi i sa otvorenim metalnim cijevima. Nadalje, kada je skupina izlagana trominutnom prisilnom plivanju u hladnoj vodi, kontrolna skupina je bila smještena u identične prazne kontejnere na tri minute. Protokol izlaganja životinja lažnom stresu se ponavljao $3\times$ kroz 10 dana dok životinje nisu dosegle 28. tjedan starosti. Nakon završenog

protokola lažnog stresa životinje su anestetizirane kombinacijom ketamina (Ketanest, Pfizer Corporation, koncentracije $30 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) intramuskularno i inhalacijom izoflurana (Forane® isofluranum, Abbott Laboratories Ltd) u staklenoj komori, nakon čega su žrtvovane. Lijevi režanj jetre (Slika 2) uzorkovan je i smrznut u tekućem dušiku te pohranjen na $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.

2.6. Laboratorijska analiza uzoraka

Laboratorijske analize provedene su na Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka Odjela za biologiju u Osijeku. Analize su uključivale pripremu ekstrakata jetre, a detaljnom analizom u ekstraktima jetre određena je:

- Količina produkata LPO
- Omjer količina GSH/GSSG
- Aktivnost enzima CAT
- Aktivnost enzima GST
- Aktivnost SOD
- Aktivnost enzima GR
- Aktivnost enzima GPx
- Koncentracija proteina

2.6.1. Priprema ekstrakta za mjerenje produkata lipidne peroksidacije

Zamrznuti uzorci jetre usitnjavani su u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka. U usitnjeno tkivo (100 mg) dodano je 1 mL hladne 1.15 % otopine KCl-a nakon čega je uzorak dodatno homogeniziran pomoću Ultra turrax T10 homogenizatora (1300 rpm; IKA, Königswinter, Njemačka). Dobiveni homogenat se dalje koristio za mjerenje produkata LPO.

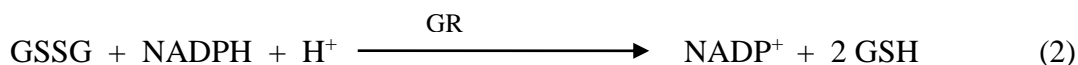
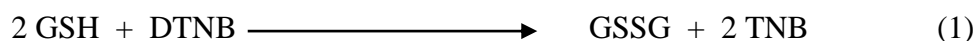
2.6.2. Određivanje količine reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline

Razina LPO u homogenatima jetre štakora određena je metodom prema Ohkawi i suradnicima (1979), koja se temelji na mjerenju koncentracije reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS), uglavnom MDA.

Neposredno nakon homogenizacije, otpipetirano je 0.2 mL homogenata i redom se dodavalo 0.2 mL 8.1% SDS-a, 1.5 mL 20% octene kiseline (AA, pH 3.5) i 1.5 mL 0.8% tiobarbiturne kiseline (TBA) nakon čega se smjesa vorteksirala. Nakon dodatka vode do 4 mL ukupnog volumena, reakcijska smjesa inkubirana je tijekom 60 min u vodenoj kupelji na 95 °C. Tijekom zagrijavanja kisele reakcijske smjese lipidni peroksidi se raspadaju te nastali MDA reagira s TBA. Kao posljedica te reakcije nastaje crveno obojenje. Nakon inkubacije u kupelji, reakcijska smjesa se hladila 15 min te je smjesi dodan 1 mL destilirane vode i 5 mL n-butanola i piridina u međusobnom omjeru 15:1 (v/v) uz jako miješanje. Uzorci su zatim centrifugirani 15 min na 4000 g i 4 °C, pri čemu se odvajaju dva sloja. U gornjem sloju mjeri se koncentracija TBARS-a na valnoj duljini 532 nm. Količina TBARS-a odnosno MDA izračunata je pomoću jednadžbe pravca standardnog dijagrama pripremljenog s 1,1,3,3-tetrametoksipropanom kao standardom. Rezultati su izraženi u nmol po gramu svježe tvari ($\text{nmol} \times \text{g}^{-1}$ svježe tvari).

2.6.3. Određivanje omjera koncentracija reduciranog i oksidiranog glutationa

Smrznuti uzorci jetre usitnjeni su u tarionika s tučkom uz korištenje tekućeg dušika. Potom je 100 mg tkiva homogenizirano u 1 mL 5% (w/v) sulfosalicilne kiseline (SSA) a dobiveni homogenat je potom ostavljen na ledu 10 minuta. Slijedilo je centrifugiranje homogenata 10 minuta pri 10000 g i +4 °C. Supernatanti su dekantirani i čuvani na ledu do određivanja količine ukupnog GSH (tGSH=GSH+GSSG), GSH i GSSG. Sadržaj tGSH mjeri se pomoću kinetičke metode, u kojoj GSH uzrokuje kontinuiranu redukciju 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoične kiseline (DTNB) pri čemu nastaje žuto obojeni produkt 5-tio-2-nitrobenzoična kiselina (TNB), dok se nastali GSSG reciklira pomoću GR i NADPH (jednadžbe (1) i (2); Akerboom i Sies, 1981; Nair i sur., 1991). Porast apsorbancije, do kojeg dolazi uslijed nastanka TNB-a, mjeri se na 412 nm. Reakcijski koktel sastojao se od 8 mL 100 mM natrij-fosfatnog pufera (pH 7.0) s dodatkom 1 mM EDTA, 228 µL otopine GR ($6 \text{ U} \times \text{mL}^{-1}$) i 228 µL otopine DTNB koncentracije $1.5 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$. U kvarcnu kivetu dodano je 750 µL reakcijskog koktela, 50 µL uzorka razrijeđenog $20\times$ i 250 µL NADPH ($0.16 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$). Za mjerenje GSSG u uzorak je dodano 2 µL vinilpiridina i 6 µL trietanolamina. Uzorci su potom stajali sat vremena te je sadržaj GSSG određen kinetičkom metodom kao i tGSH. Količina tGSH i GSSG određena je pomoću standardne krivulje GSH. Konačni rezultati su izraženi kao omjer količina GSH/GSSG.

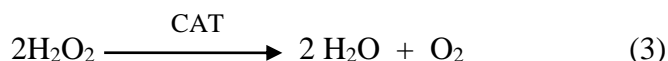


2.6.4. Priprema enzimskih ekstrakata za određivanje aktivnosti katalaze i glutathion S-transferaze

Zamrznuti uzorci jetre usitnjavani su u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka. U usitnjeno tkivo (200 mg) dodano je 2 mL hladnog ekstrakcijskog pufera (100 mM Na-fosfatni pufer, pH 7.0, 1 mM EDTA) nakon čega je uzorak dodatno homogeniziran pomoću Ultra turrax T10 homogenizatora (1300 rpm; IKA, Königswinter, Njemačka). Enzimi su zatim ekstrahirani stajanjem 10 minuta na ledu te centrifugiranjem 15 minuta na 20000 g i +4 °C. Dobiveni supernatanti korišteni su za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima CAT i GST, te određivanje koncentracije proteina.

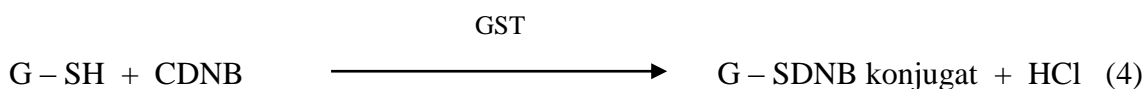
2.6.5. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost CAT (EC 1.11.1.6) u enzimskim ekstraktima određena je spektrofotometrijski koristeći H_2O_2 kao supstrat (Aebi, 1984; jednađba (3)). Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti sadrži 0.036% otopinu H_2O_2 u 50 mM Na-fosfatnom puferu (pH 7.0). U UV kivetu s 1450 μL reakcijske smjese dodano je 50 μL enzimskog ekstrakta koji je prethodno razrijeđen 50 \times . Pad apsorbancije uslijed razgradnje H_2O_2 , mjeren je svakih 10 sekundi tijekom 3 minute pri valnoj duljini od 240 nm. Specifična aktivnost CAT izražena je kao količina (μmol) razgrađenog H_2O_2 po minuti po miligramu proteina koristeći ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), odnosno u jedinicama aktivnosti CAT po miligramu proteina ($\text{U} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteina}$; $\text{U} = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \text{ proteina}$).



2.6.6. Određivanje aktivnosti glutation S-trasferaze

Aktivnost GST (EC 2.5.1.13) u enzimskim ekstraktima određena je spektrofotometrijskim praćenjem nastajanja konjugata između 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) s GSH pri 340 nm (Habig i sur, 1974; jednažba (4)). U UV kivetu s 1350 μL Na-fosfatnog pufera (pH 6.5), koji je sadržavao 1 mM EDTA, dodano je 50 μL 75 mM otopine GSH i 50 μL 30 mM otopine CDBN. Enzimska reakcija započinje dodavanjem 50 μL enzimskog ekstrakta, prethodno razrijeđen 50 \times . Kako dolazi do stvaranja G-SDNB konjugata, prati se porast apsorbancije na 340 nm svakih 30 sekundi tijekom 5 minuta. Jedna jedinica aktivnosti GST jednaka je količini enzima potrebnog za konjugaciju 1 μmola CDBN s GSH po minuti pri pH 6.5 i temperaturi od 25 $^{\circ}\text{C}$. Specifična aktivnost GST izražena je kao količina nastalog konjugata u μmol po minuti po gramu proteina koristeći ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon = 9.600 \text{ mM}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$), odnosno u jedinicama aktivnosti GST po gramu proteina ($\text{U}\times\text{g}^{-1}_{\text{proteina}}$; $\text{U} = \mu\text{mol}\times\text{min}^{-1}$).



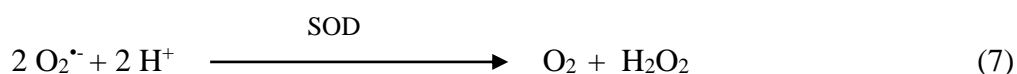
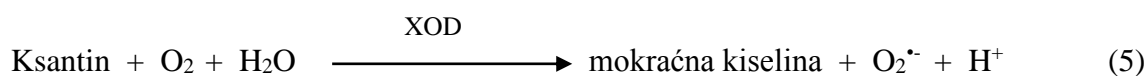
2.6.7. Priprema enzimskih ekstrakata za određivanje aktivnosti SOD, GR i GPx

Zamrznuto tkivo jetre usitnjavano je pomoću tarionika i tučka u tekućem dušiku. U usitnjeno tkivo (200 mg) dodano je 2 mL hladnog ekstrakcijskog pufera (50 mM Na-fosfatni pufer, pH 7.8, 1 mM EDTA) nakon čega je uzorak dodatno homogeniziran pomoću Ultra turrax T10 homogenizatora (1300 rpm; IKA, Königswinter, Njemačka). Enzimi su zatim ekstrahirani stajanjem 10 min na ledu te centrifugiranjem 15 min na 20000 g i +4 $^{\circ}\text{C}$. Dobiveni supernatanti korišteni su za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima GR, GPX i SOD, te određivanje koncentracije proteina.

2.6.8. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze

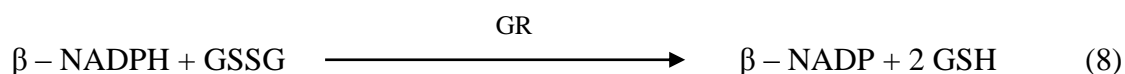
Aktivnost SOD (EC 1.15.1.1) u enzimskim ekstraktima određena je prema metodi koju su opisali Flohé i ötting (1971), a mjeri se kao stupanj inhibicije redukcije citokroma C

pomoću $O_2^{\bullet-}$. Jedna jedinica SOD-a inhibira stopu redukcije citokroma C za 50%, u povezanom sustavu pomoću ksantin-oksidade (XOD) i ksantina (jednadžba (5), (6), (7)). U VIS kivetu dodana je reakcijska smjesa koja se sastojala od 1450 μL reakcijskog koktela (0.05 mM otopina citokroma C, 1 mM otopinom ksantina), 25 μL enzimskog ekstrakta koji je prethodno 20 \times razrijeđen s Na-fosfatnim puferom (pH 7.8) te 25 μL otopine XOD koncentracije 0.1 $\text{U}\times\text{mL}^{-1}$. Porast aporbancije praćen je na 550 nm tijekom 3 min, svakih 30 sek. Aktivnost je računata koristeći postotak inhibicije citokroma C te je izražena kao $\text{U}\times\text{mg}^{-1}$ proteina.



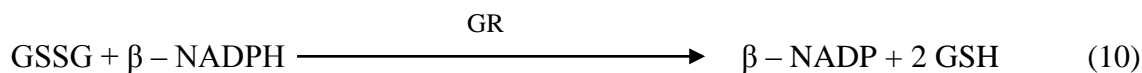
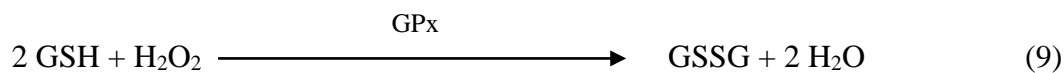
2.6.9. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze

Aktivnost GR (EC 1.6.4.2) u enzimskim ekstraktima određena je prema metodi koju su opisali Dolphin i suradnici (1989). Metoda se temelji na redukciji GSSG-a uz prisustvo GR-a te NADPH kao reducensa (jednadžba (8)). U UV kivetu dodano je 400 μL reakcijskog pufera (100 mM Na-fosfatni pufer pH 7.5, 1 mM EDTA) 500 μL 2 mM otopine GSSG, 50 μL enzimskog ekstrakta koji je prethodno razrijeđen 2 \times te 50 μL 2 mM otopine NADPH. Enzimska reakcija započinje odmah nakon dodatka NADPH, a prati se pad apsorbancije na 340 nm svakih 10 sekundi kroz 2 minute. Pad apsorbancije se javlja zbog oksidacije NADPH odnosno smanjenja količine NADPH. Jedna jedinica enzima reducira 1 μmol GSSG po minuti pri pH 7.6 i 25 $^{\circ}\text{C}$. Specifična aktivnost GR izražena je kao količina (μmol) NADPH po minuti po gramu proteina koristeći ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon = 6.220 \text{ mM}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$), odnosno u jedinicama aktivnosti GR po gramu proteina ($\text{U}\times\text{g}^{-1}$ proteina; $\text{U} = \mu\text{mol}\times\text{min}^{-1}$).



2.6.10. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze

Aktivnost GPx (EC 1.11.1.9) mjerena je prema modificiranoj metodi koju je opisao Wendel (1980), a koristi H₂O₂ kao supstrat. Prema ovoj metodi, aktivnost GPx indirektno se određuje tako što se mjeri oksidacija NADPH u NADP⁺ što je popraćeno smanjenjem apsorbancije pri 340 nm (jednadžba (9), (10)). U UV kivetu dodano je 1500 µL reakcijskog koktela, 25 µL enzimskog ekstrakta prethodno razrijeđenog 20× te 25 µL 0.042 % otopine H₂O₂. Reakcijski koktel koji se sastojao od 9.2 mL reakcijskog pufera (50 mM kalij-fosfatnog pufera, 0.4 mM EDTA, pH 7.0), 1 mg NADPH, 100 µL otopine GR (100 U×mL⁻¹) i 50 µL 200 mM otopine GSH, promiješan je inverznim okretanjem te je pH podešen na 7.0 pomoću 1 M HCl ili 1 M NaOH. Enzimska reakcija započinje dodavanjem H₂O₂, a prati se pad apsorbancije na 340 nm tijekom 3 minute svakih 30 sekundi. Jedna jedinica enzima katalizira oksidaciju 1 µmol GSH pomoću H₂O₂ u GSSG po minuti pri pH 7.0 i 25 °C. GPx aktivnost se računala koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent za NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$), te je izražena u jedinicama aktivnosti GPx po gramu proteina ($\text{U} \times \text{g}^{-1}_{\text{proteina}}$; $\text{U} = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$).



2.6.11. Određivanje koncentracije proteina

Ukupna koncentracija topljivih proteina u proteinskim ekstraktima određena je metodom po Bradfordu (1976), koristeći albumin goveđeg seruma kao standard.

Uzorke smo prije mjerenja razrijedili 100× te dodali po 100 µL razrijeđenog uzorka u epice (duplikat za svaki uzorak). Zatim se u epicu dodaje 1 mL reagensa Bradford te se izmiješa. Nakon 5 min inkubacije pri sobnoj temperaturi, sadržaj smo prebacili u kivetu i mjerili apsorbanciju pri 595 nm prema slijepoj probi kojoj su dodani 100 µL vode i reagens.

2.7. Statistička obrada podataka

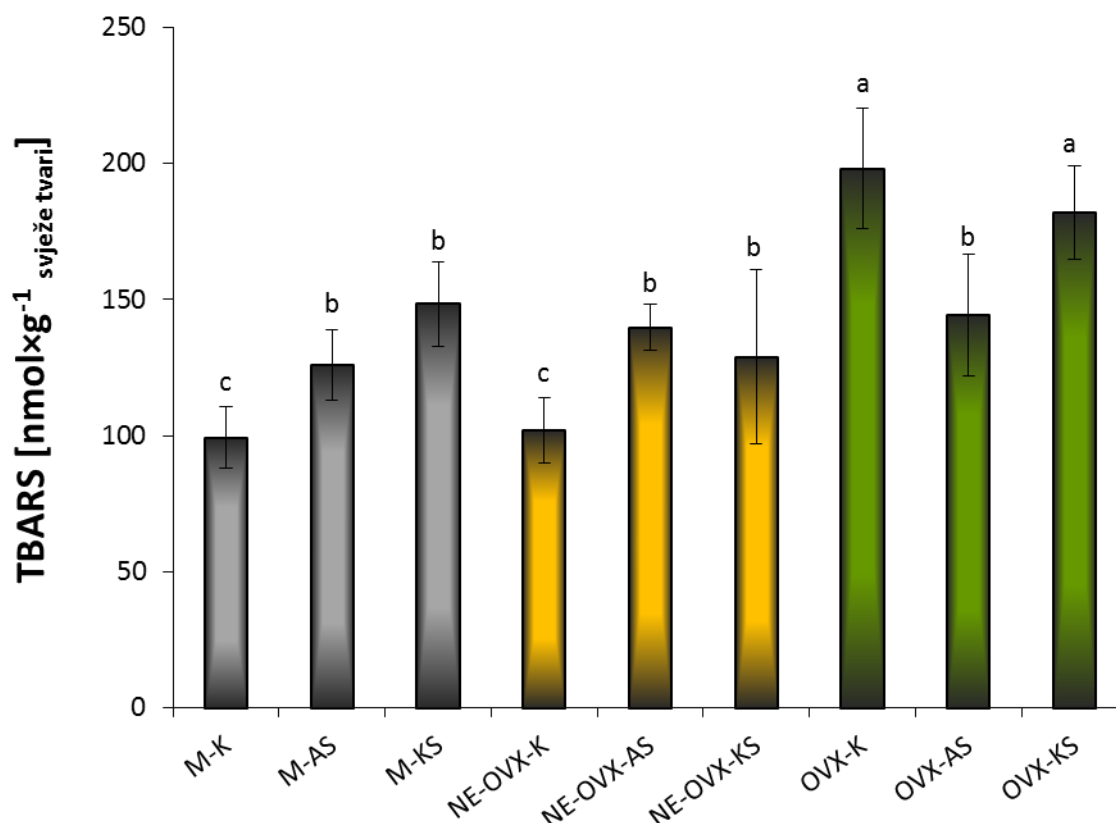
Podaci dobiveni ovim istraživanjem obrađeni su u statističkom programu STATISTICA 12.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, OK, USA). Rezultati su izraženi kao srednja

vrijednost \pm standardna devijacija (SD). Razlike između srednjih vrijednosti kontrole i skupina akutnog i kroničnog stresa uspoređene su pomoću analize varijance s jednim promjenjivim faktorom (one-way ANOVA). *Post hoc* testiranje pomoću Duncan testa provedeno je kako bi odredili koje se skupine međusobno razlikuju. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od 5 %.

3. REZULTATI

3.1. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na razinu lipidne peroksidacije u jetri štakora

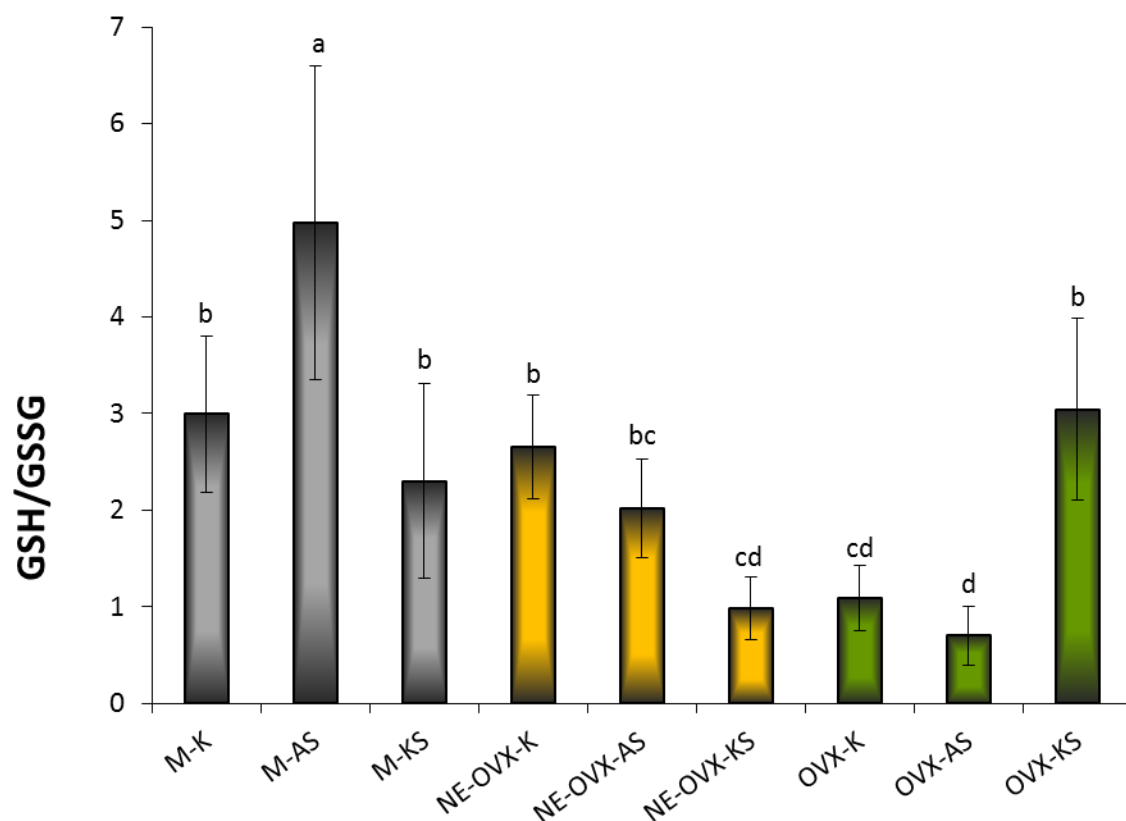
Razina LPO praćena je mjerenjem količine TBARS-a. Akutni i kronični stres su kod mužjaka uzrokovali porast količine TBARS-a u odnosu na kontrolnu skupinu M-K. Akutni je stres uzrokovao porast za 26.69% (M-AS), a kronični za 49.36% (M-KS) u odnosu na M-K. Kronični stres je povećao količinu TBARS-a u odnosu na akutni, ali razlika nije statistički značajna (Slika 5). Kod ženki je prisutan sličan trend porasta. Ženke koje su bile izložene akutnom stresu (NE-OVX-AS) imale su značajni porast količine TBARS-a za 37.11%, dok su ženke izložene kroničnom stresu (NE-OVX-KS) imale značajni porast količine TBARS-a za 26.60% u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu NE-OVX-K. Ovarijsktomija je uzrokovala bitno drugačije rezultate. Količina TBARS-a nakon akutnog stresiranja niža je u odnosu na kontrolnu skupinu (OVX-K) i to za 27.25%, dok akutni stres nije uzrokovao značajnu promjenu u količini TBARS-a, u odnosu na OVX-K. Ovarijsktomija je uzrokovala značajno povećanje količine TBARS-a u odnosu na kontrolne mužjake (M-K) i ženke (NE-OVX-K). Također, u skupinama mužjaka i neovarijsktomiziranih ženki nema statistički značajne razlike u razini TBARS-a između akutnog i kroničnog stresa, dok skupina OVX-KS ima veću količinu TBARS-a.



Slika 5. Količina TBARS-a u jetri štakora izloženih akutnom i kroničnom stresu (mužjaci - sivi stupići, neovarijektomirane ženke - žuti stupići, ovarijsktomirane ženke - tamnozeleni stupići). M-K: kontrolna skupina mužjaka izlagana lažnom stresu; M-AS: skupina mužjaka izložena akutnom stresu; M-KS: skupina mužjaka izložena kroničnom stresu; NE-OVX-K: kontrolna skupina ženki izložena lažnom stresu; NE-OVX-AS: skupina ženki izložena akutnom stresu; NE-OVX-KS: skupina ženki izložena kroničnom stresu; OVX-K: kontrolna skupina ovarijsktomiranih ženki izložena lažnom stresu; OVX-AS: skupina ovarijsktomiranih ženki izložena akutnom stresu; OVX-KS: skupina ovarijsktomiranih ženki izložena kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.2. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na omjer koncentracija reduciranog i oksidiranog glutationa

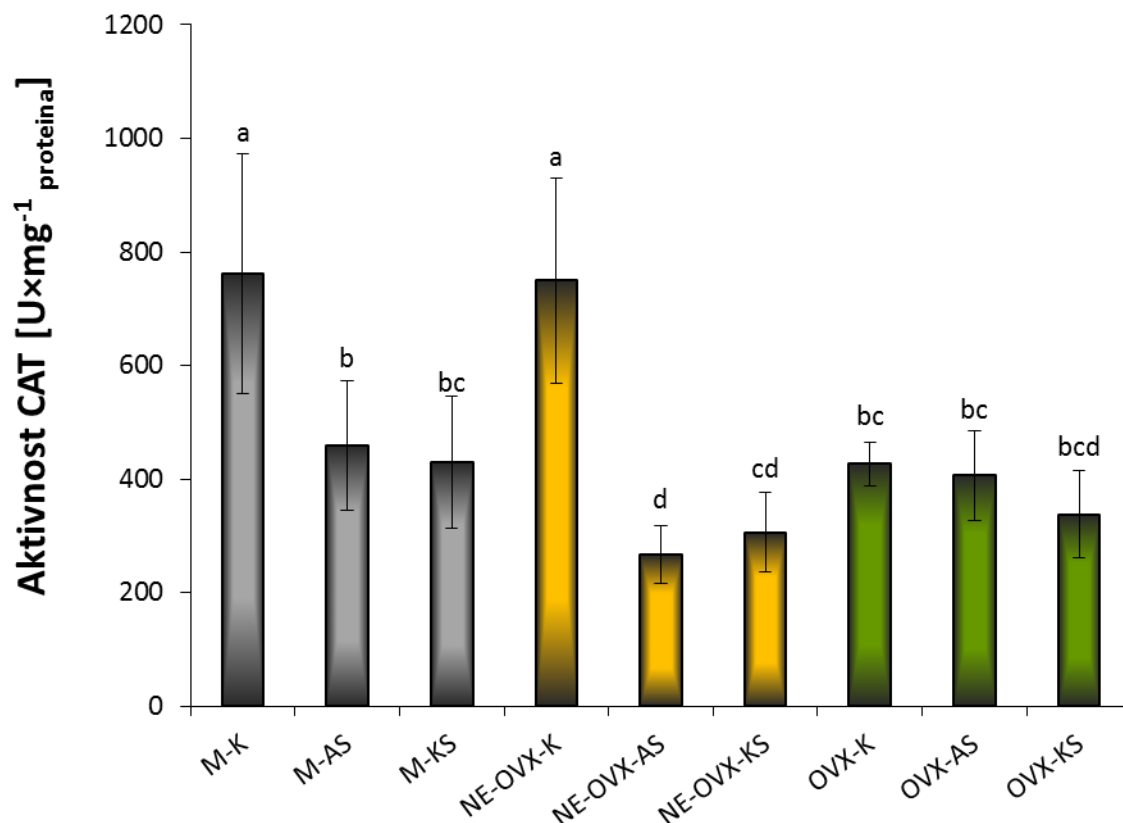
Kronični i akutni stres su različito djelovali na mužjake štakora. Akutni stres je uzrokovao značajni porast omjera GSH/GSSG za 66.07%, dok kronični stres nije imao utjecaja na omjer GSH/GSSG u odnosu na kontrolu M-K. Za razliku od mužjaka ženke su pokazale drugačiji odgovor na akutni i kronični stres (Slika 6). Dok je kronični stres kod ženki (NE-OVX-KS) značajno smanjio omjer GSH/GSSG za 63.19% u odnosu na kontrolu NE-OVX-K, akutni stres nije imao značajan utjecaj na omjer GSH/GSSG, u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovarijsktomirane ženke (OVX-KS) su imale značajno veći omjer GSH/GSSG nakon izlaganja kroničnom stresu, koji je za 180.52% veći od kontrole OVX-K, dok akutni stres nije uzrokovao značajne promjene. Skupine M-AS, NE-OVX-AS i OVX-AS se međusobno razlikuju u omjerima GSH/GSSG. Ovarijsktomija je uzrokovala smanjenje omjera GSH/GSSG u kontrolnoj skupini OVX-K u odnosu na ostale kontrolne skupine, M-K i NE-OVX-K.



Slika 6. Omjer GSH i GSSG u jetri štakora izloženih akutnom i kroničnom stresu (mužjaci - sivi stupići, neovarijektomirane ženke - žuti stupići, ovarijsktomirane ženke - tamnozeleni stupići). M-K: kontrolna skupina mužjaka izlagana lažnom stresu; M-AS: skupina mužjaka izložena akutnom stresu; M-KS: skupina mužjaka izložena kroničnom stresu; NE-OVX-K: kontrolna skupina ženki izložena lažnom stresu; NE-OVX-AS: skupina ženki izložena akutnom stresu; NE-OVX-KS: skupina ženki izložena kroničnom stresu; OVX-K: kontrolna skupina ovarijsktomiranih ženki izložena lažnom stresu; OVX-AS: skupina ovarijsktomiranih ženki izložena akutnom stresu; OVX-KS: skupina ovarijsktomiranih ženki izložena kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.3. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost katalaze u jetri štakora

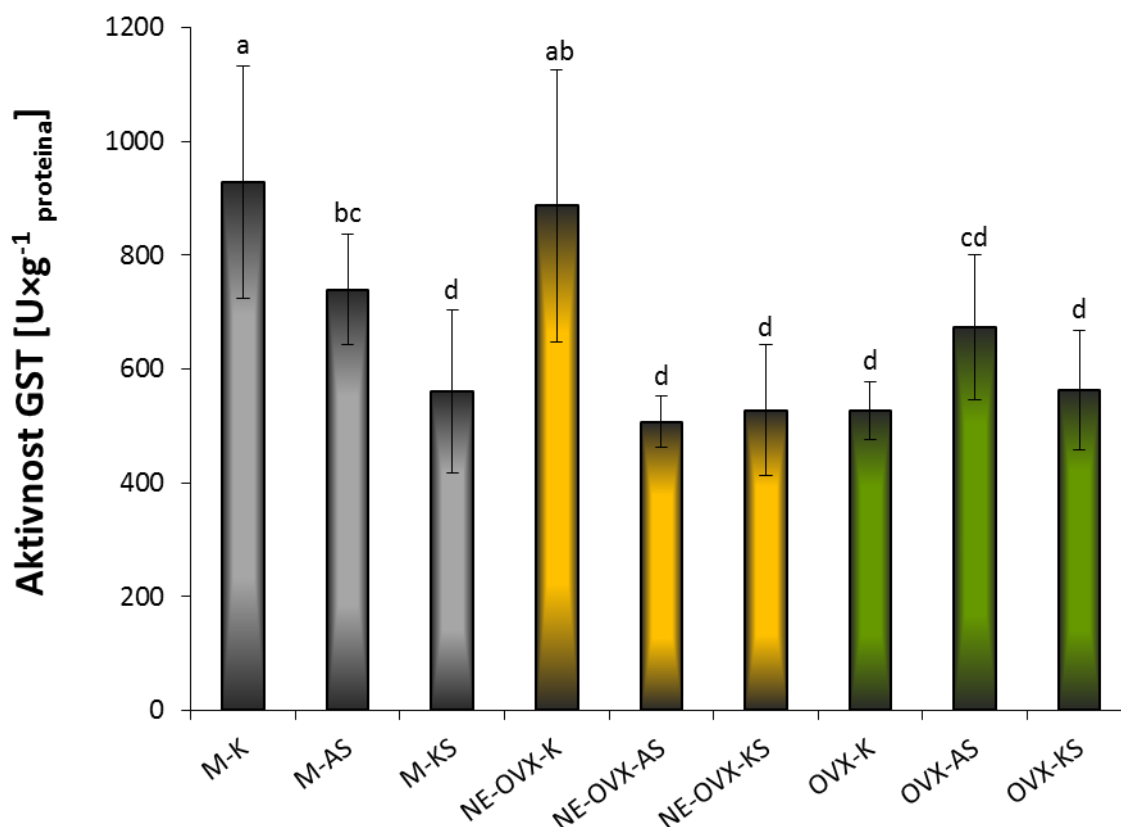
Akutni i kronični stres značajno su utjecali na smanjenje aktivnosti CAT kod mužjaka (M-AS, M-KS) u odnosu na kontrolnu skupinu, M-K. Kronični stres u skupini M-KS utjecao je na smanjenje aktivnosti CAT u odnosu na M-K za 43.55%, dok je akutni stres u skupini M-AS utjecao na smanjenje aktivnosti za 39.80% (Slika 7). Kod neovarijektomiranih skupina ženki koje su izlagane akutnom i kroničnom stresu (NE-OVX-AS, NE-OVX-KS) također je zabilježeno značajno smanjenje aktivnosti CAT u odnosu na kontrolnu skupinu (NE-OVX-K). U skupini ženki izloženih akutnom stresu, NE-OVX-AS, aktivnost CAT je smanjena za 64.49% u odnosu na kontrolu NE-OVX-K, dok je kod skupine izložene kroničnom stresu, NE-OVX-KS, aktivnost smanjena za 59.17%. Kod ovarijektomiranih ženki akutni i kronični stres nisu utjecali na aktivnost CAT u odnosu na kontrolu OVX-K. Statistički značajne razlike nema niti među skupinama mužjaka (M-AS i M-KS) kao ni među skupinama neovarijektomiranih ženki (NE-OVX-AS i NE-OVX-KS) izlaganih akutnom i kroničnom stresu. Između mužjaka i ženki podvrgnutih kroničnom stresu (M-KS, NE-OVX-KS) nema značajne razlike u aktivnosti CAT, dok je akutni stres značajno smanjio aktivnost CAT kod ženki NE-OVX-AS, u odnosu na skupinu mužjaka M-AS. Skupina NE-OVX-AS, u odnosu na mužjake M-AS, ima smanjenu aktivnost CAT za 41.92%, a u odnosu na skupinu OVX-AS ima smanjenu aktivnost za 21.17%. Između skupina M-AS i OVX-AS nema statistički značajne razlike u aktivnosti CAT. Ovarijska operacija je uzrokovala značajno smanjenje aktivnosti CAT u kontrolnoj skupini OVX-K u odnosu na ostale kontrolne skupine, M-K i NE-OVX-K.



Slika 7. Aktivnost CAT u jetri štakora izloženih akutnom i kroničnom stresu (mužjaci - sivi stupići, neovarijektomirane ženke - žuti stupići, ovarijsktomirane ženke - tamnozeleni stupići). M-K: kontrolna skupina mužjaka izlagana lažnom stresu; M-AS: skupina mužjaka izložena akutnom stresu; M-KS: skupina mužjaka izložena kroničnom stresu; NE-OVX-K: kontrolna skupina ženki izložena lažnom stresu; NE-OVX-AS: skupina ženki izložena akutnom stresu; NE-OVX-KS: skupina ženki izložena kroničnom stresu; OVX-K: kontrolna skupina ovarijsktomiranih ženki izložena lažnom stresu; OVX-AS: skupina ovarijsktomiranih ženki izložena akutnom stresu; OVX-KS: skupina ovarijsktomiranih ženki izložena kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.4. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost glutation S-trasferaze u jetri štakora

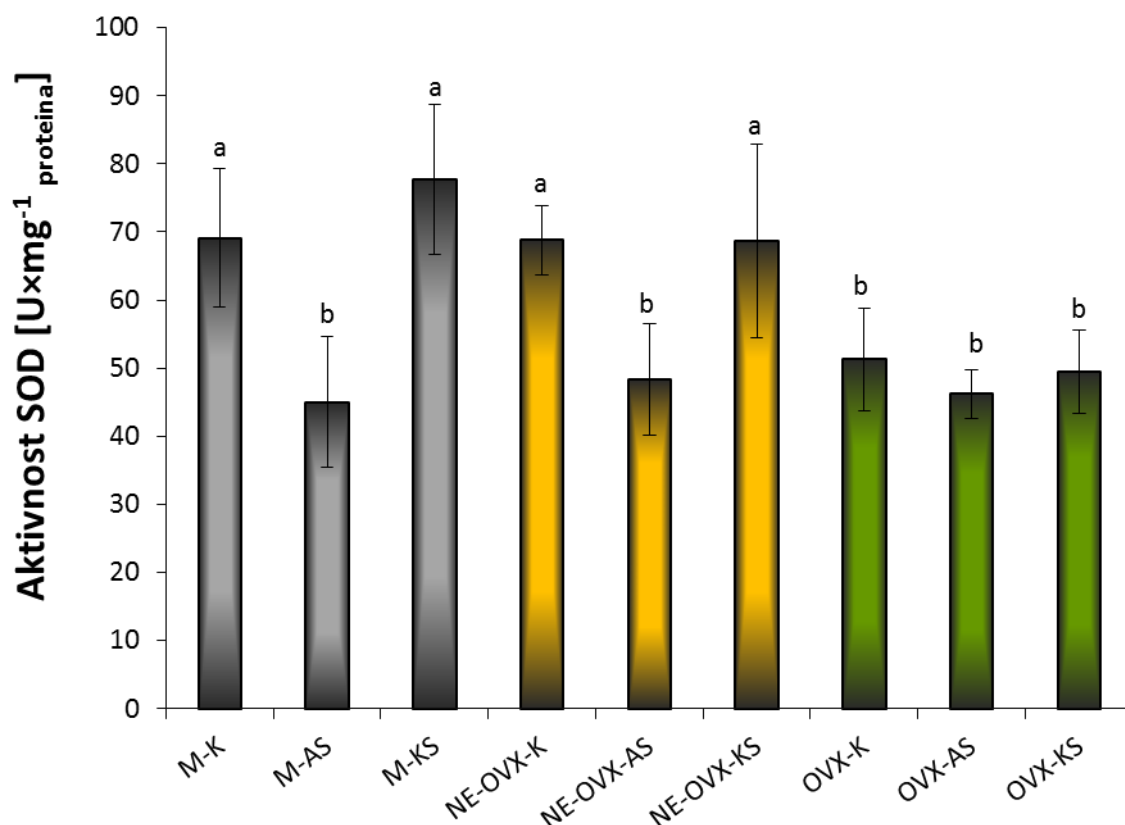
Akutni stres u skupini mužjaka, M-AK, izazvao je značajno smanjenje aktivnosti GST za 20.46%, dok je kronični stres uzrokovao značajno smanjenje za 39.63%. Kod neovarijektomiranih ženki aktivnost se također smanjila nakon izlaganja akutnom i kroničnom stresu, ali između akutnog i kroničnog stresa nema značajne razlike. Akutni stres u skupini NE-OVX-AS uzrokovao je smanjenje aktivnosti za 42.79%, a kronični u skupini NE-OVX-KS smanjenje za 40.50% u odnosu na kontrolu NE-OVX-K. Ovarijsktomija je uzrokovala znatno drugačije rezultate. Akutni stres je uzrokovao blagi porast aktivnosti koji nije statistički značajan, kao što nema promjene aktivnosti niti nakon izlaganja kroničnom stresu. Posljedica ovarijsktomije je vidljiva u kontrolnoj skupini, OVX-K, gdje je ovarijsktomija uzrokovala značajno smanjenu aktivnost u odnosu na druge kontrolne skupine (M-K i NE-OVX-K) (Slika 8).



Slika 8. Aktivnost GST u jetri štakora izloženih akutnom i kroničnom stresu (mužjaci - sivi stupići, neovarijektomirane ženke - žuti stupići, ovarijektomirane ženke - tamnozeleni stupići). M-K: kontrolna skupina mužjaka izlagana lažnom stresu; M-AS: skupina mužjaka izložena akutnom stresu; M-KS: skupina mužjaka izložena kroničnom stresu; NE-OVX-K: kontrolna skupina ženki izložena lažnom stresu; NE-OVX-AS: skupina ženki izložena akutnom stresu; NE-OVX-KS: skupina ženki izložena kroničnom stresu; OVX-K: kontrolna skupina ovarijektomiranih ženki izložena lažnom stresu; OVX-AS: skupina ovarijektomiranih ženki izložena akutnom stresu; OVX-KS: skupina ovarijektomiranih ženki izložena kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.5. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost superoksid-dismutaze u jetri štakora

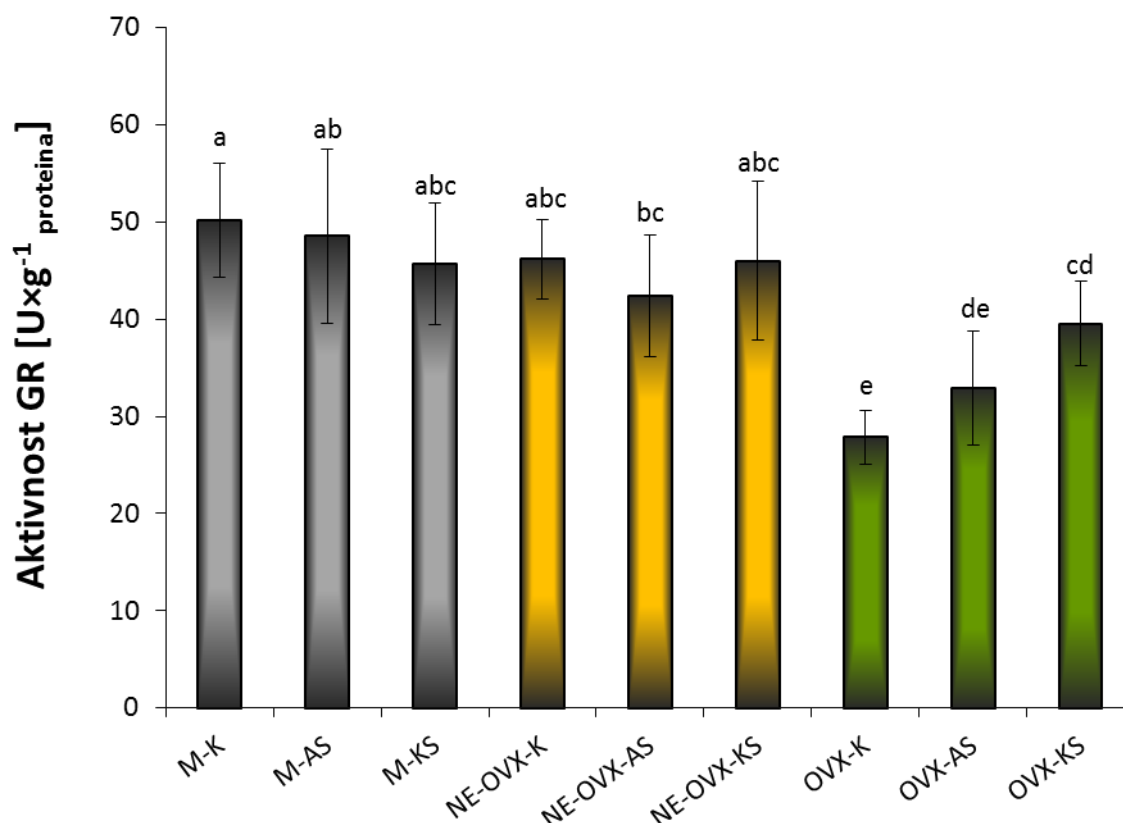
Kod mužjaka koji su bili akutno stresirani, aktivnost SOD značajno je smanjena za 42.11%, dok kronični stres nije izazvao značajne promjene aktivnosti u odnosu na odgovarajuću kontrolnu skupinu (M-K) (Slika 9). Isto tako, aktivnost enzima kod ženki koje su bile izložene akutnom stresu (NE-OVX-AS) smanjena je za 29.68%, dok kronični stres nije rezultirao znatnim promjenama u odnosu na kontrolu NE-OVX-K. Ovarijsktomirane skupine ženki (OVX-AS, OVX-KS) nakon izlaganja akutnom i kroničnom stresu nisu pokazale značajne promjene u aktivnosti SOD-a u odnosu na OVX-K. Unatoč tomu, vidljiv je blagi pad nakon izlaganja akutnom stresu što se može usporediti s rezultatima mužjaka i neovarijsktomiranih ženki. Nadalje, između različitih skupina koje su bile pod akutnim stresom nema velikih razlika u aktivnosti enzima (M-AS, NE-OVX-AS, OVX-AS). Kronično tretirane skupine mužjaka i ženki ne pokazuju značajnu razliku u aktivnosti SOD-a, dok je kod ovarijsktomiranih ženki aktivnost znatno manja u odnosu na M-KS i NE-OVX-KS. Ovarijsktomija je značajno smanjila aktivnost SOD-a u kontrolnoj skupini (OVX-K) u odnosu na kontrolne skupine mužjaka (M-K) i ženki (NE-OVX-K).



Slika 9. Aktivnost SOD u jetri štakora izloženih akutnom i kroničnom stresu (mužjaci - sivi stupići, neovarijektomirane ženke - žuti stupići, ovarijsktomirane ženke - tamnozeleni stupići). M-K: kontrolna skupina mužjaka izlagana lažnom stresu; M-AS: skupina mužjaka izložena akutnom stresu; M-KS: skupina mužjaka izložena kroničnom stresu; NE-OVX-K: kontrolna skupina ženki izložena lažnom stresu; NE-OVX-AS: skupina ženki izložena akutnom stresu; NE-OVX-KS: skupina ženki izložena kroničnom stresu; OVX-K: kontrolna skupina ovarijsktomiranih ženki izložena lažnom stresu; OVX-AS: skupina ovarijsktomiranih ženki izložena akutnom stresu; OVX-KS: skupina ovarijsktomiranih ženki izložena kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.6. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost glutation-reduktaze u jetri štakora

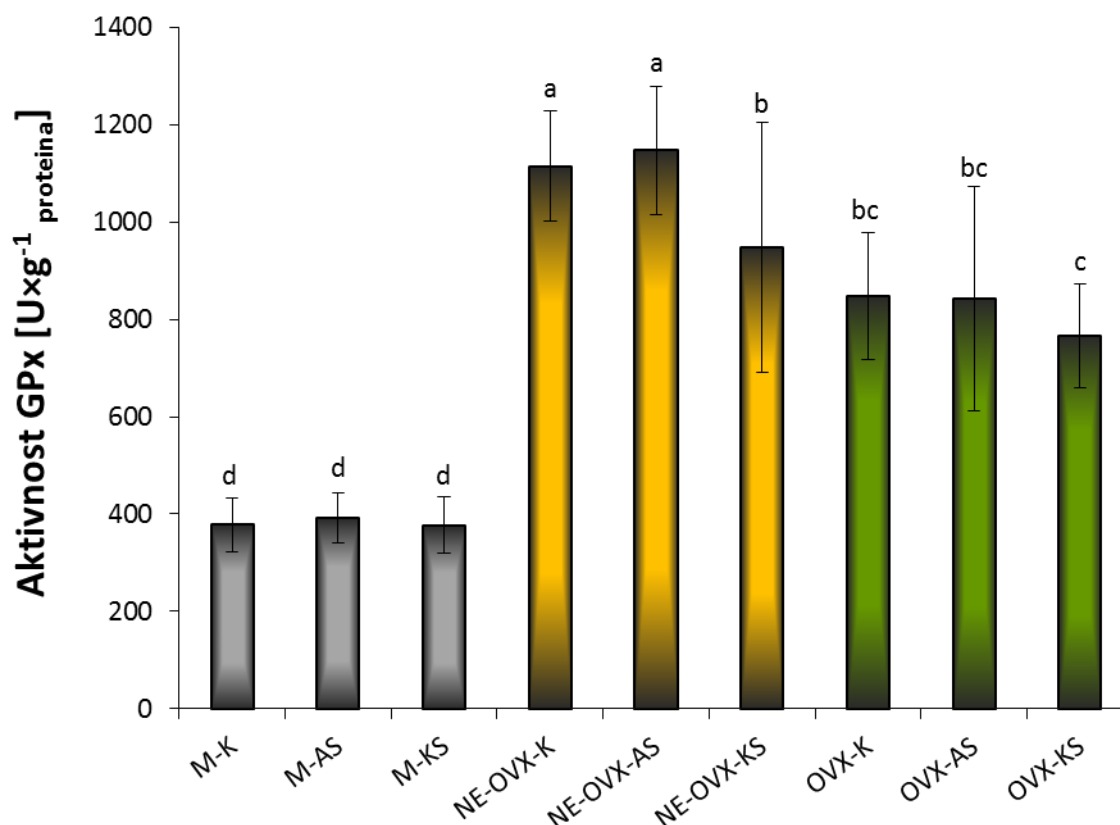
Aktivnost GR u skupinama mužjaka (M-AS, M-KS) kao i u skupinama neovarijektomiranih ženki (NE-OVX-AS, NE-OVX-KS) nije se značajno promijenila nakon izlaganja akutnom i kroničnom stresu u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine (M-K i NE-OVX-K). Jednako tako, nije prisutna statistički značajna razlika između pojedinih skupina mužjaka i ženki podvrgnutih akutnom (M-AS i NE-OVX-AS) i kroničnom stresu (M-KS i NE-OVX-KS). Ovarijsktomija je značajno smanjila aktivnost GR u kontrolnoj skupini (OVX-K) u odnosu na kontrolne skupine mužjaka (M-K) i ženki (NE-OVX-K). Jednako je tako aktivnost GR bila smanjena kod OVX-AS u odnosu na skupine M-AS i NE-OVX-AS. U skupini ovarijsktomiranih ženki aktivnost GR je povećana kod skupine izložene kroničnom stresu (OVX-KS) u odnosu na kontrolu OVX-K. U odnosu na OVX-K kronični je stres uzrokovao je porast aktivnosti za 42.01% u skupini OVX-KS (Slika 10).



Slika 10. Aktivnost GR u jetri štakora izloženih akutnom i kroničnom stresu (mužjaci - sivi stupići, neovarijektomirane ženke - žuti stupići, ovarijektomirane ženke - tamnozeleni stupići). M-K: kontrolna skupina mužjaka izlagana lažnom stresu; M-AS: skupina mužjaka izložena akutnom stresu; M-KS: skupina mužjaka izložena kroničnom stresu; NE-OVX-K: kontrolna skupina ženki izložena lažnom stresu; NE-OVX-AS: skupina ženki izložena akutnom stresu; NE-OVX-KS: skupina ženki izložena kroničnom stresu; OVX-K: kontrolna skupina ovarijektomiranih ženki izložena lažnom stresu; OVX-AS: skupina ovarijektomiranih ženki izložena akutnom stresu; OVX-KS: skupina ovarijektomiranih ženki izložena kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.7. Utjecaj akutnog i kroničnog stresa na aktivnost glutation-peroksidaze u jetri štakora

Kod skupina mužjaka izlaganih akutnom i kroničnom stresu (M-AS, M-KS) aktivnost GPx je ostala nepromijenjena u odnosu na kontrolu M-K. Akutni stres kod ženki (NE-OVX-AS) također nije uzrokovao promjenu aktivnosti GPx-a, dok je kronični stres kod ženki NE-OVX-KS uzrokovao značajno smanjenje aktivnosti za 14.94% u odnosu na kontrolu NE-OVX-K. Kao i kod mužjaka, kronični i akutni stres kod ovarijsktomiranih ženki nije uzrokovao promjenu u aktivnosti GPx-a u odnosu na kontrolu OVX-K. Između mužjaka, ženki i ovarijsktomiranih ženki postoji značajna razlika u aktivnosti GPx-a između kontrolnih skupina (M-K i NE-OVX-K, OVX-K), zatim između skupina izloženih akutnom (M-AS, NE-OVX-AS i OVX-AS) i kroničnom stresu (M-KS, NE-OVX-KS i OVX-KS). U odnosu na M-K, aktivnost enzima skupine NE-OVX-K je za 194.53% veća, a skupine OVX-K za 123.93%. Izlaganje akutnom stresu uzrokuje veću aktivnost kod skupina NE-OVX-AS i OVX-AS u odnosu na mužjake, i to za 191.95% i 114.50%. Izlaganje štakora kroničnom stresu uzrokovao je porast kod skupine NE-OVX-KS za 151.21%, a kod skupine OVX-KS za 103.06% u odnosu na mužjake izloženih kroničnom stresu (M-KS). Aktivnost GPx-a kontrolne skupine neovarijsktomiranih ženki je za 31.52% veća od aktivnosti kontrolne skupine ovarijsktomiranih (Slika 11).



Slika 11. Aktivnost GPx u jetri štakora izloženih akutnom i kroničnom stresu (mužjaci - sivi stupići, neovarijektomirane ženke - žuti stupići, ovarijsktomirane ženke - tamnozeleni stupići). M-K: kontrolna skupina mužjaka izlagana lažnom stresu; M-AS: skupina mužjaka izložena akutnom stresu; M-KS: skupina mužjaka izložena kroničnom stresu; NE-OVX-K: kontrolna skupina ženki izložena lažnom stresu; NE-OVX-AS: skupina ženki izložena akutnom stresu; NE-OVX-KS: skupina ženki izložena kroničnom stresu; OVX-K: kontrolna skupina ovarijsktomiranih ženki izložena lažnom stresu; OVX-AS: skupina ovarijsktomiranih ženki izložena akutnom stresu; OVX-KS: skupina ovarijsktomiranih ženki izložena kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

4. RASPRAVA

Oksidacijski stres je stanje u kojem je pomak ravnoteže u staničnim oksido-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije, a takvo stanje igra važnu ulogu u inicijaciji i progresiji različitih bolesti, a među njima i jetrenim bolestima (Depke i sur., 2009). Nakupljanje ROS-a u stanicama sisavaca pod kontrolom je enzimskog i ne-enzimskog antioksidacijskog sustava. Enzimi kao što su SOD, CAT i GPx, koji uklanjaju $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 , čine prvu liniju obrane protiv slobodnih radikala. Drugu liniju obrane čine GST i GR koji su ključni u održavanju GSH u reduciranom stanju, a to ih ne čini manje važnima od prethodno navedenih enzima. Slobodni kisikovi radikali izrazito su reaktivni te mogu reagirati sa staničnim lipidima, proteinima, ugljikohidratima i nukleinskim kiselinama (Sevanian i Hochstein, 1985). Oksidacijska oštećenja koja nastaju mogu biti rezultat prevelike proizvodnje i nakupljanja ROS-a u stanicama, ali i smanjene antioksidacijske aktivnosti enzima te smanjene koncentracije antioksidacijskih zaštitnih molekula/tvari kao što je GSH.

Najbolji pokazatelj da je neko tkivo pod oksidacijskim oštećenjem je povećana količina TBARS-a (Halliwell, 1992; Liu i Mori, 1994). ROS uvelike povećava LPO (Esterbauer i Cheesman, 1990) te bi se u našem istraživanju povećana razina LPO općenito objasnila povećanim stvaranjem ROS-a u jetri te smanjenjem aktivnosti pojedinih antioksidacijskih enzima, kao što su SOD i CAT. Kod mužjaka i neovarijektomiranih ženki došlo je do porasta količine TBARS-a nakon izlaganja akutnom i kroničnom stresu. To ne iznenađuje s obzirom na smanjene aktivnosti antioksidacijskih enzima kod stresiranih mužjaka i ženki. Stresirani mužjaci i ženke imaju smanjene aktivnosti CAT što dovodi do nakupljanja H_2O_2 . Također, u skupinama M-AS i NE-OVX-AS se nakon izlaganja akutnom stresu smanjuje aktivnost SOD-a što dovodi do nakupljanja $O_2^{\bullet-}$. H_2O_2 i $O_2^{\bullet-}$ mogli bi biti jedan od glavnih uzroka inicijacije i progresije LPO. ROS i produkti LPO mogu direktno ili indirektno narušiti respiratorni lanac u hepatocitima te djelovati na mitohondrijski genom. To kao posljedicu može imati dodatno nakupljanje ROS-a te dovesti do disfunkcije mitohondrija što dalje može dovesti do apoptoze ili nekroze, ovisno o energetske statusu stanice (Moya i sur., 2008). Posebno je zanimljiva veza između razine LPO i ROS-a. ROS se često nakuplja u stanicama zbog smanjene aktivnosti antioksidacijskih enzima te povećava količinu TBARS-a, a s druge strane povećana količina TBARS-a dovodi do inaktivacije enzima što opet uzrokuje nakupljanje ROS-a i poticanje peroksidacije (inaktivacija CAT kod mužjaka i

neovarijektomiranih ženki nakon izlaganja akutnom i kroničnom stresu te inaktivacija SOD kod istih skupina nakon izlaganja akutnom stresu) (Demori i sur., 2006).

Mnogo veća količina TBARS-a kod kontrolne skupine ovarijektomiranih ženki (OVX-K) u odnosu na druge dvije kontrole (M-K, NE-OVX-K), djelomično potvrđuje antioksidacijsku ulogu estrogena. Naime, estrogeni mogu spriječiti lančanu reakciju stvaranja slobodnih radikala oksidacijom membrana te spriječiti LPO (Akçay i sur. 2000). Kako je nakon ovarijektomije smanjena sinteza estrogena i javlja se njihov deficit, viša razina LPO u odnosu na druge skupine je očekivana. Osim Akçaya i suradnika, slične rezultate dobili su Yoshino i suradnici (1987) koji su pokazali da su estradiol i njegovi derivati jaki endogeni antioksidansi koji smanjuju LPO u jetri i serumu miševa.

Osim ROS-a i smanjene aktivnosti antioksidacijskih enzima, povećanje količine TBARS-a može biti uzrokovano smanjenjem koncentracije GSH. Da je manjak GSH i njegove zaštitne uloge uzrok veće LPO, moglo bi se pretpostaviti za one skupine gdje je omjer GSH/GSSG dosta nizak (NE-OVX-KS, OVX-K i OVX-AS). Ovakvu promjenu u količini GSH koja je popraćena porastom LPO pokazala su brojna istraživanja koja su pratila porast LPO uzrokovan stresom (Atif i sur., 2008; Jafari i sur., 2014; Kaushik i Kaur, 2003; Kiray i sur., 2007).

Omjer GSH/GSSG je još jedan važan pokazatelj oksidacijskog oštećenja. Zahvaljujući svojoj ulozi održavanja redoks stanja u stanicama, GSH je sastavni dio brojnih istraživanja oksidacijskog stresa (Jafari i ru., 2014; Kaushik i Kaur, 2003; Liu i sur., 2000). Osim njegove ključne uloge neenzimskog antioksidansa, dodatni razlog njegova istraživanja u ovom slučaju je bila činjenica da se velikim dijelom sintetizira u hepatocitima te da opskrba drugih tkiva s GSH uvelike ovisi o jetri. Smanjenje omjera GSH/GSSG može biti rezultat prisutnosti ROS-a, povećane aktivnosti GST-a i ograničene sinteze GSH. Iako ne statistički značajno, vidljiv je trend pada omjera kod neovarijektomiranih i ovarijektomiranih ženki nakon izlaganja akutnom stresu. Liu i suradnici (2000) dobili su isti rezultat nakon izlaganja štakora akutnom vježbanju, ali kako su u svom eksperimentu mjerili i razinu cistina i cisteina, napravili su poveznicu i objasnili svoj rezultat. Cistin je limitirajući prekursor za sintezu GSH te kako su zabilježili njegov pad u jetri štakora, bilo je jasno da je to jedan od glavnih razloga smanjenja GSH. Iako se u našem eksperimentu nije mjerila razina cistina, sasvim je jasno da je jedan od mogućih objašnjenja smanjenja omjera GSH/GSSG upravo smanjena razina cistina. Nadalje, smanjenje omjera kod ovarijektomiranih ženki nakon djelovanja akutnog stresa (OVX-AS) može se dodatno objasniti vrlo visokom aktivnošću GST, koja koristi GSH kao supstrat te na

taj način smanjuje omjer u živim sustavima. Nadalje, izlaganje skupine OVX-KS kroničnom stresu popraćeno je značajnim porast omjera GSH/GSSG, a kod iste skupine je zabilježen i značajan porast aktivnosti GR u odnosu na odgovarajuće kontrole. Visoka aktivnost GR doprinijela je obnavljanju GSH u stanicama koji može štititi stanice od daljnjih oksidacijskih oštećenja. Vincent i suradnici (2001) su radili istraživanje na štakorima prekomjerne težine i dokazali da povećanje razine GSH u srčanom tkivu može nakon nekog vremena zaštititi stanice od oksidacijskih oštećenja. Kako se naši rezultati omjera GSH/GSSG mogu samo djelomično povezati s enzimima koji direktno ili indirektno utječu na količinu GSH (GR, GPx, GST), može se pretpostaviti da je iz nekih razloga došlo do narušavanja ciklusa GPx/GR. Ovarijsktomija je uzrokovala pad omjera GSH/GSSG kod kontrole (OVX-K) u odnosu na druge dvije kontrolne skupine (M-K, NE-OVX-K), ali i izlaganje akutnom stresu je rezultirao značajno manjem omjeru (OVX-AS) u usporedbi s mužjacima i neovarijsktomiranim ženka (M-AS i NE-OVX-AS). Proučavajući utjecaj ovarijsktomije i nedostatka cirkulirajućih estrogena, Wu i suradnici (2004) su utvrdili da je visoka razina oksidacijskog stresa popraćena nedostatkom GSH. Nedostatak GSH kod ovarijsktomiranih ženki prema nekim autorima može biti zbog uloge estradiola u sintezi GSH (Urata i sur., 2006).

Superoksidni anion je jedan od značajnijih radikala koji nastaje u stanici, a uklanja ga SOD dismutacijom u O_2 i H_2O_2 te time sprječava nastajanje još toksičnijeg HO^\bullet radikala. Nakon izlaganja jedinki mužjaka i neovarijsktomiranih ženki kroničnom stresu, SOD aktivnost se pokazala većom u odnosu na akutni, ali u odnosu na kontrole je u blagom ali statistički neznačajnom porastu ili gotovo jednaka. S obzirom da je $O_2^{\bullet-}$ prvi od mnogobrojnih ROS-a koji nastaje nakon što O_2 primi elektron, može se pretpostaviti kako će se vjerojatnost njegova nastajanja povećati ukoliko dođe do povećane opskrbe tkiva kisikom. Kronični stres, koji je bio kombinacija brojnih psiholoških i fizičkih stresora, pokazao je da konstantno djelovanje stresora kroz dulji period nije promijenio opskrbu jetre kisikom te da se i $O_2^{\bullet-}$ polaganim stvaranjem kroz to razdoblje učinkovito otklanja. Ovi rezultati aktivnosti SOD-a nisu u skladu s pojedinim istraživanjima. Primjerice, Kaushik i Kaur (2003) izlagali su štakore 21 dan niskim temperaturama te su mjerili aktivnost u tkivima mozga, srca, bubrega, tankog crijeva i jetre. U svim tkivima zabilježili su značajno smanjenje aktivnosti SOD. Također, Sarumathi i Saravanan (2012) su nakon trodnevnog izlaganja štakora imobilizacijskom stresu zabilježili smanjenje aktivnosti u tkivu jetre i bubrega. S druge strane u našem istraživanju, akutni stres u skupinama M-AS i NE-OVX-AS izazvao je pad aktivnosti SOD-a. Uz

pretpostavku da je u situaciji trenutnog djelovanja stješnjavanja u metalnim cijevima došlo do takvih metaboličkih promjena koje su dovele do porasta koncentracije kisika u jetri kao središnjeg metaboličkog organa, može se zaključiti da je došlo i do prekomjerne proizvodnje O_2^{\bullet} . No, koncentracija je bila toliko velika da ju dostupna koncentracija enzima nije uspjela prevesti u H_2O_2 te je dio enzima vjerojatno inaktiviran od strane ROS-a. Da ROS može inaktivirati SOD, potvrđuju Salo i suradnici (1990). Istražujući eritrocite te sposobnost Cu/ZnSOD-a da zaštiti iste od oksidacijskog oštećenja, višesatni tretman s H_2O_2 rezultirao je inaktivacijom enzima. Smanjena aktivnost SOD-a značila bi i manju proizvodnju H_2O_2 , što bi objasnilo nižu aktivnost CAT nakon izlaganja akutnom stresu, jer je CAT poznat po visokoj supstratnoj specifičnosti te da funkcionira samo kada su u pitanju visoke koncentracije peroksida (Chance i sur., 1979).

Trend ponašanja aktivnosti enzima se razlikuje kod ovarijektomiranih ženki, između kontrolne i skupina izloženih stresu nema statistički značajne razlike. Važno je primijetiti da OVX-K ima značajno manju aktivnost antioksidacijskih enzima u odnosu na M-K i NE-OVX-K što je rezultat manjka estrogena nastalog ovarijektomijom.

H_2O_2 koji nastaje dismutacijom O_2^{\bullet} , dalje se razgrađuje zahvaljujući CAT i GPx-u. Kod sve tri skupine štakora (M, NE-OVX, OVX) aktivnost CAT smanjena je nakon izlaganja akutnom i kroničnom stresu u odnosu na odgovarajuće kontrole, ali između akutnog i kroničnog stresa pojedinih skupina nema značajnih razlika. Smanjenje aktivnosti nakon izlaganja stresu, bilo akutnom ili kroničnom u odnosu na kontrolu, može biti posljedica nedovoljne koncentracije H_2O_2 s obzirom da je CAT aktivna samo u slučaju izrazito visokih koncentracija H_2O_2 . To se može pretpostaviti jer je zabilježena i smanjena aktivnost SOD-a nakon izlaganja akutnom stresu, posebno kod mužjaka i neovarijektomiranih ženki (M-AS i NE-OVX-AS). Također, nakupljanjem i raspadanjem H_2O_2 *in vivo* nastaje HO^{\bullet} koji uzrokuje oštećenja proteina u jetri, a time i oštećenje te inaktivaciju CAT. Pigeolet i sur. (1990) dokazali su da CAT može biti inaktivirana od strane hidroksilnih radikala, ali i O_2^{\bullet} . Ovo bi moglo biti djelomično objašnjenje zašto eventualno nije uslijedila nešto veća aktivnost, posebno nakon izlaganja kroničnom stresu jer pojedini enzimi imaju sposobnost adaptacije na stres, kao u slučaju SOD-a. Slične rezultate dobili su Zaidi i suradnici (2005) nakon kratkotrajnog izlaganja štakora imobilizacijskom stresu, a slično objašnjenje predložili su Şahin i Gümüşlü (2007). S obzirom na aktivnost kontrolnih skupina, najmanju aktivnost očekivano je pokazala OVX-K skupina. Manjak estrogena, uzrokovan ovarijektomijom, doveo je do slabljenja zaštite od slobodnih radikala i povećanja oksidacijskih oštećenja što je

najbolje vidljivo na razini LPO ove skupine. Ovarijsktomija je mogla dovesti do nakupljanja ROS-a u stanicama te na taj način uzrokovati oštećenje CAT. To bi moglo objasniti zašto još dodatno nije došlo do većih promjena u aktivnosti CAT nakon izlaganja akutnom i kroničnom stresu u odnosu na kontrolu.

Puno učinkovitiji enzim u uklanjanju H_2O_2 je GPx jer je aktivan i u uvjetima niske koncentracije H_2O_2 . Ono što se odmah primjećuje u rezultatima je iznimno niska aktivnost kod mužjaka (M) u odnosu na ženke (NE-OVX, OVX). Kako je estradiol dominantniji kod ženki te utječe na povećanje ekspresije GPx-a, može se očekivati da razlika između mužjaka i ženki postoji. Nadalje, prema Pintu i Bartleyu (1969) GPx aktivnost je veća kod ženki nego kod mužjaka i to za oko 50 %, što je u skladu s dobivenim rezultatima. S obzirom na činjenicu da GPx koristi GSH kao supstrat u reakcijama koje katalizira, može se napraviti poveznica s dobivenim omjerom GSH/GSSG. Omjer je veći kod kontrolne skupine mužjaka, a posebno kod skupine koja je bila izložena akutnom stresu u odnosu na većinu skupina ženki. Dobivena niska aktivnost GPx mogla bi uzrokovati visoku koncentraciju GSH, tj. povećani omjer GSH/GSSG.

Osim GPx-a koji utječe na koncentraciju GSH u stanicama, GR ima ključnu ulogu u održavanju njegove potrebne količine tako što reducira oksidirani oblik. U većini provedenih istraživanja se nakon akutnog ili kroničnog stresa aktivnost GR-a znatno smanjuje ili povećava (Đorđević i sur., 2010; Vuković i sur., 2014), dok su naši rezultati pokazali da je aktivnost uglavnom ostala nepromijenjena. To se uočava kod skupina M i NE-OVX te da nema značajnijih promjena nakon izlaganja bilo akutnom bilo kroničnom stresu. GR sudjeluje u reakciji redukcije GSSG-a uz prisutnost NADPH, te tako opet nastaje GSH (Salvemini i sur., 1999). Kako je vidljivo da nema velike promjene aktivnosti, što nije u skladu s promjenom omjera GSH/GSSG u pojedinim skupinama, postoji mogućnost da je u pitanju dostupna koncentracija NADPH. Ovu pretpostavku potkrepljuje nekoliko istraživanja aktivnosti GR-a nakon kroničnog izlaganja štakora etanolu (Oh i sur., 1998; Szveda i sur., 1993). U našim rezultatima se ističe skupina ovarijsktomiranih ženki OVX-K koja ima znatno nižu aktivnost u odnosu na M-K i NE-OVX-K. Aktivnost je također manja i nakon izlaganja akutnom i kroničnom stresu u odnosu na odgovarajuće skupine mužjaka (M-AS, M-KS) i neovarijsktomiranih ženki (NE-OVX-AS, NE-OVX-KS). Kao i kod prethodnih enzima, mogući uzrok dobivenih rezultata mogao bi biti manjak estrogenske antioksidacijske zaštitne uloge. Uz manjak estrogena te znatno smanjenu aktivnost CAT i GPx ovarijsktomiranih ženki može doći do nakupljanja H_2O_2 , a poznato je da ekspresija GR-a može biti inhibirana

visokim koncentracijama H_2O_2 (Seo i sur., 2006). U odnosu na OVX-K, posebno se ističe skupina OVX-KS kod koje je zabilježen značajan porast aktivnosti GR-a, što je u korelaciji s porastom omjera GSH/GSSG u istoj skupini. Poastom aktivnosti GR-a znači da ujedno raste i omjer GSH/GSSG.

Pored važnosti GR-a za održavanje unutarstaničnog GSH, neophodan je i detoksikacijski učinak GST-a. Većina dobivenih rezultata nije u skladu s rezultatima drugih istraživanja. Primjerice, u istraživanju koje su proveli Jafari i suradnici nakon što su štakore izlagali psihološkom i fizičkom stresu zabilježen je porast aktivnosti GST-a. Iste rezultate dobili su Kaushik i Kaur (2003) nakon što su štakore izlagali kronično niskim temperaturama. Kaushik i Kaur su zabilježili značajno povećanje aktivnosti GST-a u svim tkivima, osim srca. Porast aktivnosti, iako ne statistički značajan, vidljiv je kod ovarijektomiranih ženki koje su bile izložene akutnom stresu (OVX-AS). Kako je GST učinkovit i u uklanjanju međuprodukata LPO (Singhal i sur., 1992) njihovim konjugiranjem s GSH, trend porasta aktivnosti GST-a gotovo u potpunosti prati trend koncentracije TBARS-a. Tamo gdje je veća aktivnost GST-a u nekoj od skupina, manja je razina LPO, a gdje je manja aktivnost enzima, veća je razina LPO. Stoga, spomenuti porast aktivnosti kod skupine OVX-AK može doprinijeti smanjenju koncentracije međuprodukata LPO, što je i vidljivo u našim rezultatima. Kako je za reakcije konjugacije potreban GSH, manji pad omjera GSH/GSSG u istoj skupini govori u prilog činjenici da je blagi porast aktivnosti GST bio trenutni odgovor organizma, u pokušaju da se obrani od štetnih tvari i oksidacijskog oštećenja. Kod mužjaka i neovarijektomiranih ženki zabilježen je značajan pad aktivnosti nakon izlaganja kroničnom i akutnom stresu u odnosu na kontrole M-K, NE-OVX-K. Razlog tomu može biti inaktivacija enzima koja je nastala uslijed oksidacijskog stresa. Štoviše, toj inaktivaciji je mogla posredovati velika količina TBARS-a jer je dokazano da je LPO glavni mehanizam oštećenja jetrenih stanica (Videla i sur., 2003). Većina istraživanja potvrđuju da uslijed akutnog i kroničnog stresa dolazi do porasta aktivnosti GST-a te su rijetka koje karakterizira smanjenje. Primjerice, Atif i suradnici (2008) su nakon akutnog izlaganja štakora stješnjavanju u metalnim cijevima dobili smanjenu aktivnost GST u hipokampusu, striatumu i frontalnom korteksu. Smanjenje aktivnosti su isto objasnili kao posljedicu oksidacijske inaktivacije.

Akutni kao i kronični stres su u našem istraživanju prouzročili pojavu oksidacijskog stresa u jetri, koji je karakteriziran povećanjem razine LPO i narušenom antioksidacijskom zaštitom jetre, koja se očituje smanjenjem omjera GSH/GSSG i aktivnosti većine antioksidacijskih enzima. Oksidacijsko oštećenje jetre može doprinijeti dodatnom

napredovanju različitih kroničnih oboljenja jetre, između ostalog i nastanku nealkoholne masne bolesti jetre, budući da je oksidacijski stres jedan od ključnih patofizioloških mehanizama ove bolesti. Osim toga oksidacijski stres se povezuje i s nastankom ciroze, hemokromatoze, ali i brojnim drugim oboljenjima. LPO u jetri je također jedan od uzroka smanjenja aktivnosti enzima koji sudjeluju u metabolizmu lijekova (monooksigenaze), tako da smanjenje jetrenog metabolizma može prouzročiti promjenu farmakokinetičkog odgovora kod pacijenata koji su pod terapijom lijekovima (Nepomniashchikh i sur., 2009). Budući da je jetra središnji metabolički organ, jetrene bolesti često nisu ograničene samo na jetru, već se oksidacijske i antioksidacijske promjene u jetri mogu reflektirati na cijeli organizma, te mogu biti uzrok oksidacijskog i antioksidacijskog statusa krvi. Ovim istraživanjem utvrđeni su markeri oksidacijskog stresa u jetri mužjaka, ženki i ovarijskomiranih ženki induciranih akutnim i kroničnim stresom, kao i spolno-specifične razlike između pokazatelja oksidacijskog i antioksidacijskog statusa.

5. ZAKLJUČAK

1. Akutni stres je uzrokovao nastanak oksidacijskog stresa u jetri mužjaka i neovarijektomiranih ženki štakora. Biomarkeri oksidacijskog stresa u ovom istraživanju su povećanje razine LPO i smanjenje antioksidacijskog obrambenog odgovora, kojeg karakterizira pad omjera GSH/GSSG i smanjenje aktivnosti većine antioksidacijskih enzima (CAT, SOD, GST).
2. Kronični stres je uzrokovao pojavu oksidacijskog stresa u jetri mužjaka i neovarijektomiranih ženki štakora što je vidljivo iz povećanja razine LPO i smanjenja aktivnosti antioksidacijskih enzima CAT i GST.
3. Ovarijsktomija, koja uzrokuje manjak antioksidacijske zaštite estrogenima, uzrokuje pojavu oksidacijskog stresa (povećanje LPO, smanjen omjer GSH/GSSG te smanjenje aktivnosti CAT, GST, SOD i GR) u jetri ovarijsktomiranih ženki.
4. Oksidacijski i antioksidacijski odgovor u jetri, na akutni i kronični stres, se međusobno razlikuje kod mužjaka i kod neovarijsktomiranih ženki štakora u nekim mjerenim pokazateljima kao i u njihovom intenzitetu (omjer GSH/GSSG, GPx, GST).
5. Odgovor ovarijsktomiranih ženki na akutni i kronični stres znatno se razlikuje u odnosu na mužjake i neovarijsktomirane ženke.
6. I akutni i kronični stres narušavaju antioksidacijsku zaštitu jetre što rezultira nastankom oksidacijskog stresa u jetri. Oksidacijsko oštećenje jetre može doprinijeti dodatnom napredovanju različitih kroničnih oboljenja jetre gdje je oksidacijski stres jedan od ključnih patofizioloških mehanizama. Osim toga, oksidacijske i antioksidacijske promjene u jetri mogu se reflektirati na cijeli organizma, te mogu biti uzrok oksidacijskog i antioksidacijskog statusa krvi.

6. LITERATURA

Aebi H. 1984. Catalase. In: Bergmeyer, H. U., ed. *Methods Enzymol* New York: Academic Press; 1974:673–683.

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-6.

Ahlbom E, Prins GS, Ceccatelli S. 2001. Testosterone protects cerebellar granule cells from oxidative stress-induced cell death through a receptor mediated mechanism. *Brain Res* 892: 255–262.

Akçay T, Dinçer Y, Kayali R, Çolgar U, Oral E, Çakatay U. 2000. Effects of hormone replacement therapy on lipid peroxides and oxidation system in postmenopausal women. *J Toxicol Environ Health A* 59:1-5.

Akerboom TP, Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77:373-382.

Andersen ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. 2004. Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Braz J Med Biol Res* 37:791-7.

Arnetz BB, Wasserman J, Petrini B, Brenner SO, Levi L, Eneroth P. 1987. Immune function in unemployed women. *Psychosom Med* 49:3-12.

Atif F, Yousuf S, Agrawal AK. 2008. Restraint stress-induced oxidative damage and its amelioration with selenium. *Eur J Pharmacol* 600:59-63.

Atroshi F, Paulin L, Paalanen T, Westermarck T. 1990. Glutathione level in mice brain after testosterone administration. *Adv Exp Med Biol* 264:199-202.

Bergman B, Brismar B. 1994. Hormone Levels and Personality Traits in Abusive and Suicidal Male Alcoholics. *Clin Exp Res* 18:311-316.

Betteridge DJ. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism* 49:3-8.

Bloom W, Fawcett DW. 1975. Liver and gall bladder. In A textbook of histology (W. Bloom and D. W. Fawcett, eds.). W. B. Saunders, Philadelphia, , pp. 688–718.

Bosoi CR, Yang X, Huynh J, Parent-Robitaille C, Jiang W, Tremblay M, Rose CF. 2012. Systemic oxidative stress is implicated in the pathogenesis of brain edema in rats with chronic liver failure. *Free Radic Biol Med* 52:1228-35.

Bourne PG, Rose RM, Mason JW. 1968. 17-OCHS levels in combat: Special forces “A-Team” under threat of attack. *Arch Gen Psychiatry* 19: 135-140.

Brigelius-Flohè R. 2006. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem* 387:1329-35.

Brigelius-Flohè R, Maiorino M. 2013. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 1830:3289-3303.

Brunton PJ, McKay AJ, Ochedalski T, Piastowska A, Rebas E, Lachowicz A, Russell JA. 2009. Central opioid inhibition of neuroendocrine stress responses in pregnancy in the rat is induced by the neurosteroid allopregnanolone. *J Neurosci* 29:6449-60.

Budec M, Koko V, Milovanovic T, Balint-Peric L, Petkovic A. 2002. Acute ethanol treatment increases level of progesterone in ovariectomized rats. *Alcohol* 26:173-8.

Burt AD, Day CP. 2002. Pathophysiology of the liver. In Pathology of the Liver (R. N. M. MacSween, A. D. Burt, B. C. Portmann, K. G. Ishak, P. J. Scheuer and P. P. Anthony, eds.). Churchill Livingstone, New York, pp. 67-105.

Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. 2009. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol* 83:519-548.

Chakraborti A, Gulati K, Ray A. 2008. Age related differences in stress-induced neurobehavioral responses in rats: Modulation by antioxidants and nitregeric agents. *Behav Brain Res* 194:86-91.

Chambers I, Frampton J, et al. 1986. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J* 5:1221-1227.

Chan L, O'Malley BW. 1976. Mechanism of action of the sex steroid hormones (first of three parts). *N Engl J Med* 294:1322-1328.

Chance B, Sies H, Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605.

Chrousos GP. 1992. Regulation and dysregulation of the hypothalamic– pituitary–adrenal axis: the corticotropin releasing hormone perspective. *Endocrinol Metab Clinics NA* 21:833-858.

Chrousos GP, Gold P. 1992. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267:1244–1252.

Chrousos GP. 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* 5:374-381.

Cichoż-Lach H, Michalak A. 2014. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol* 20:8082-8091.

Costantini D, Carere C, Caramaschi D, Koolhaas JM. 2008. Aggressive and non-aggressive personalities differ in oxidative status in selected lines of mice (*Mus musculus*). *Biol Lett* 4:119-122.

Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10405-10409.

De Kloet RE. 1991. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Front Neuroendocrinol* 12:95- 164.

Demori I, Voci A, Fugassa E, Burlando B. 2006. Combined effects of high-fat diet and ethanol induce oxidative stress in rat liver. *Alcohol* 40:185-40191.

Diemen V, Trindade N, Trindade R (2006) Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cir Bras* 21:425-425

Dolphin D, Poulson R, Avramović O. 1989. Glutathione: Chemical, biochemical, and medical aspects: John Wiley & Sons Inc.

Dym O, Eisenberg D. 2001. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci* 10:1712-1728.

Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG, Tompkins RG. 1989. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB J* 3:174-177.

Đorđević J, Đorđević A, Adžić M, Niciforović A, Radojčić MB. 2010. Chronic Stress Differentially Affects Antioxidant Enzymes and Modifies the Acute Stress Response in Liver of Wistar Rats. *Physiol Res* 59:729-736.

Elahi MM, Kong YX, Matata BM. 2009. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev* 2:259-269.

Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. 1989. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad Res Commun* 6:67-75.

Esterbauer H, Cheeseman KH. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407-422.

Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247.

Flohé L. 1987. The selenoprotein glutathione peroxidase in Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects -Part A. New York, John Wiley & Sons, Inc.

Frye CA. 2007. Progestin influence motivation, reward, conditioning, stress and/or response to drug of abuse. *Pharmacol Biochem Behav* 86:209-219.

Fu D, Hornick CA. 1995. Modulation of lipid metabolism at rat hepatic subcellular sites by female sex hormones. *Biochim Biophys Acta* 1254:267-273.

Glavin GB, Paré WP, Sandbak T, Bakke HK, Murison R. 1994. Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Biobehav Rev* 18:223-249.

Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP. 1996. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem* 66:1836-1844.

Gotovac K, Jergović M, Sabioncello A, Kozarić-Kovačić D, Dekaris D. 2009. Concept of allostatic load or how to monitor an influence of chronic stress on health. Zbornik sažetaka 4. hrvatskog simpozija o poremećajima uzrokovanim stresom s međunarodnim sudjelovanjem "Stres i zdravlje" / Kozarić-Kovačić, Dragica (ur.). - Zagreb : Klinička bolnica Dubrava , 2009. 45-45 (ISBN: 978-953-98568-5-2).

Griffith OW, Mulcahy RT. 1999. The enzymes of glutathione biosynthesis: g-glutamylcysteine synthetase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 73:209-267.

Gutteridge JM, Halliwell B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15:129-135.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. 1974. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-7139.

Habig WT, Jakoby WB. 1981. Glutathion S-transferase (rat and human). *Method Enzymol* 77:218-231.

Halliwell B. 1989. Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. *Acta Neurol Scand* 126:23-33.

Halliwell B, Gutteridge JM. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280:1-8.

Halliwell B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59: 1609-1623.

Harlan Laboratories. 2009. Ovariectomy protocol.01:1-1.

Hemnani T, Parihar MS. 1998. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian J Physiol Pharmacol* 42:440-452.

Hermansa EJ, Putmanc P, Baasa JM, Gecksa NM, Kenemansa JL, Honka J. 2007. Exogenous testosterone attenuates the integrated central stress response in healthy young women. *Psychoneuroendocrinology* 32:1052–1061.

Jafari M, Salehi M, Zardooz H, Rostamkhani F. 2014. Response of liver antioxidant defense system to acute and chronic physical and psychological stresses in male rats. *Excli J* 13: 161-171.

Kalyanaraman B, Karoui H, Singh RJ, Felix CC. 1996. Detection of thiyl radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxynitrite-mediated oxidation of thiols-a high resolution ESR spin-trapping study at Q-band. *Anal Biochem* 241:75-81.

Kalil B, Leite CM, Carvalho-Lima M, Anselmo-Franci JA. 2013. Role of sex steroids in progesterone and corticosterone response to acute restraint stress in rats: sex differences. *Stress* 16:452-460.

Kankofer M, Radzki RP, Bienko M, Albera E. 2007. Anti-oxidative/Oxidative Status of rat liver after Ovariectomy. *J Vet Med A* 54:225-229.

Kaplan MH, Wheeler WF. 1983. Stress and diseases of the upper gut. 1: Stress and liver disease. *Mt Sinai J Med* 50:225-227.

Kaplan JR, Pettersson K, Manuck SB, Olsson G. 1991. Role of sympathoadrenal medullary activation in the initiation and progression of atherosclerosis. *Circulation* 84:23-32.

Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M. 1985. The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25:715-744.

Karplus PA, Schulz GE. 1989. Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: Substrate crystal structures at 2Å resolution. *J Mol Biol* 210:163-180.

Kashif SM, Zaidi R, Tariq M. Al-Qirim, Banu N. 2005. Effects of Antioxidant Vitamins on Glutathione Depletion and Lipid Peroxidation Induced by Restraint Stress in the Rat Liver. *Drugs R D* 6:157-165.

Kaushik S, Kaur J. 2003. Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. *Clin Chim Acta* 333:69-77.

Kehrer JP, Lund LG. 1994. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17:65-75.

Kiray M, Ergur BU, Bagriyanik A, Pekcetin C, Aksu I, Buldan Z. 2007. Suppression of apoptosis and oxidative stress by deprenyl and estradiol in aged rat liver. *Acta histochem* 109: 480-485.

Kogure K, Ishizaki M, Nemoto M, Kuwano H, Makuuchi M. 1999. A comparative study of the anatomy of the rat and human liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 6:171-175.

Lamberts SWJ, Verleun T, Oosterom R, DeJong P, Hackeng WHL. 1984. Corticotropin releasing factor and vasopressin exert a synergistic effect on adrenocorticotropin release in man. *J Clin Endocrinol Metab* 58:298- 303.

Liao F, Andalibi A, Qiao JH, Allayee H, Fogelman AM, Lusis AJ. 1994. Genetic evidence for a common pathway mediating oxidative stress, inflammatory gene induction, and aortic fatty streak formation in mice. *J Clin Invest* 94:877-884.

Liu J, Yeo HC, Övervik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chu DW, Brooks GA, Ames BN. 2000. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol* 89:21-28.

Liu J, Mori A. 1994. Involvement of reactive oxygen species in emotional stress: a hypothesis based on the immobilization stress-induced oxidative damage and antioxidant defense changes in rat brain, and the effect of antioxidant treatment with reduced glutathione. *Int J Stress Manag* 1:249-263.

Lu LG, Zeng MD, Mao YM, et al. 2003. Relationship between clinical and pathologic findings in patients with chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 9 (12): 2796-800.

Luperchio S, Tamir S, Tannenbaum SR. 1996. NO-Induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells. *Free Radic Biol Med* 21:513-519.

Marklund SL. 1984. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J* 222:649-55.

Marotti T, Sobočanec S, Mačak-Šafranko Ž, Šarić A, Kušić B, Balog T. 2010. Sensitivity to Oxidative Stress: Sex Matters. *Med Sci* 35:59-68.

Martins PN, Neuhaus P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Int* 27:384-392

McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055.

McEwen BS, Stellar E. 1993. Stress and the individual: Mechanism leading to disease. *Arch Intern Med* 153:2093-2101.

Meister A, Anderson ME. 1983. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 52:711-760.

Moreira PI, Custódio JB, Nunes E, et al. 2007. Estradiol affects liver mitochondrial function in ovariectomized and tamoxifen-treated ovariectomized female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 221:102-110.

Moya ET, Perez YG, Fiol M, Gianotti MM, Lladó I, Proenza AAM. 2008. Gender related differences in paraoxonase 1 response to high-fat diet-induced oxidative stress. *Obesity* 16:2232-2238.

Muñoz-Castañeda JR, Muntané J, Herencia C, Muñoz MC, Bujalance I, Montilla P, Tunez I. 2006. Ovariectomy exacerbates oxidative stress and cardiopathy induced by adriamycin. *Gynecol Endocrinol* 22:74-79.

Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B, Vasudevan, Venkataraman Prabhu G, Subramaniam V, Jagadeesan A, Narasimhan S. 2005. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clinica Chimica Acta* 360:81–86.

Nadeem A, Masood A, Masood N, Afzal Gilani R, Ahmad Shah Z. 2006. Immobilization stress causes extra-cellular oxidant-antioxidant imbalance in rats: Restoration by L-NAME and vitamin E. *Eur Neuropsychopharmacol* 16:260-267.

Nair S, Singh SV, Krishan A. 1991. Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. *Cytometry* 12:336-342.

Navarro-Arevalo A, Sanchez-Del Pino MJ. 1998. Age and exercise-related changes in lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in liver and soleus muscle tissues of rats. *Mech Ageing Dev* 104:91-102.

Nelson DL, Cox MM. 2008. *Lehninger principles of biochemistry, 5th edn.* W.H. Freeman, New York, USA, pp 559.

Nepomniashchikh VA, Lomivorotov VV, Deryagin MN, Lomivorotov VN, Kniazkova LG. 2009. Oxidative stress and monooxygenase liver function in patients with coronary heart disease and multiple organ dysfunction syndrome. *Eur J Anaesthesiol* 26:140-146.

Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA. 2011. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 3:17.

Oh SI, Kim CHI, Chun HJ, Park SCH. 1998. Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver. *J Nutr* 128:758-763.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-8.

Okado-Matsumoto A, Fridovich I. 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276:38388-38393.

Palma HE, Wolkmer P, Gallio M, Corrêa MM, Schmatz R, Thomé GR, Pereira LB, Castro VS, Pereira AB, Bueno A, de Oliveira LS, Rosolen D, Mann TR, de Cecco BS, Graça DL, Lopes ST, Mazzanti CM. Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin. *Mol Cell Biochem* 386:199-210.

Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. 2007. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 9:775-806.

Perry ACF, Jones R, et al. 1992. Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. *Biochem J* 285: 863-870.

Phillips MI. 1987. Functions of angiotensin II the central nervous system. *Ann Rev Physiol* 49:413-435.

Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, Remacle J. 1990. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 51:283-297.

Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield DA. 2004. Free Radicals: Key to Brain Aging and Heme Oxygenase as a Cellular Response to Oxidative Stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59:478-493.

Possamai FP, Fortunato JJ, Feier G, Agostinho FR, Quevedo J, Wilhelm Filho D, Dal-Pizzol F. 2007. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Enviro Toxicol Pharmacol* 23:198-204.

Prokai-Tatrai K, Perjesi P, Rivera-Portalatin NM, Simpkins JW, Prokai L. 2008. Mechanistic investigations on the antioxidant action of a neuroprotective estrogen derivative. *Steroids* 73:280-288.

Ratzliff V, Friedman SL. 1997. Pathobiology of hepatic stellate cells. In *Functional Heterogeneity of Liver Tissue: From Cell Lineage Diversity to Sublobular Compartment-Specific Pathogenesis* (F. Vidal-Vanaclocha, ed.). R. G. Landes Company, Austin, pp. 133-160.

Retana-Márqueza S, Bonilla-Jaimea H, Vázquez-Palacios G, Martínez-García R, Velázquez-Moctezuma J. 2003. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Horm Behav* 44:327-337.

Riggs BL, Khosla S, Melton III LJ. 2002. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23:279-302.

Ross ME, Evinger MJ, Hyman SE, Carroll JM, Mucke L, Comb M, Reis DJ, Joh TH, Goodman HM. 1990. Identification of a functional glucocorticoid response element in the phenylethanolamine N-methyltransferase promoter using fusion genes introduced into chromaffin cells in primary culture. *J Neurosci* 10:520-530.

Şahin E, Gümüşlü S. 2007. Immobilization stress in rat tissues: Alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Comp Biochem Physiol C* 144:342-347.

Şahin E, Gümüşlü S. 2007. Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and anti-oxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization-cold). *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:425-431.

Salo DC, Pacifici RE, Lin SW, Giulivi C, Davies KJA. 1990. Superoxide Dismutase Undergoes Proteolysis and Fragmentation following Oxidative Modification and Inactivation. *J Biol Chem* 265:11919-11927.

Salvemini F, Frazee A, Iervolino A, Filosa S, Salzano S, Ursini MV. 1999. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. *J Biol Chem* 274:2750-2757.

Sánchez-Valle V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Méndez-Sánchez N. 2012. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr Med Chem* 19:4850-4860.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews* 21: 55-89.

Sarumathi A, Saravanan N. 2012. Antioxidant status in kidney and liver of rats during immobilization stress and treated with *Centella asiatica* (Linn.). *Intl J Biol Sci* 2:165-169.

Scibior D, Czeczot H. 2006. Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw* 60:170-180.

Seo JS, Lee KW, Rhee JS, Hwang DS, Lee YM, Park HG, Ahn IY, Lee JS. 2006. Environmental stressors (salinity, heavy metals, H₂O₂) modulate expression of glutathione reductase (GR) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquat Toxicol* 80:281-289.

Sevanian A, Hochstein P. 1985. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological system. *Annu Rev Nutr* 5:365- 390.

Shuster LT, Gostout BS, Grossardt BR, Rocca WA. 2008. Prophylactic oophorectomy in premenopausal women and long-term health. *Menopause Int* 14:111-116.

Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82:291-295.

Singal AK, Jampana SC, Weinman SA. 2011. Antioxidants as therapeutic agents for liver disease. *Liver Int* 3:1432-1448.

Singhal SS, Saxena M, Ahmad H, Awasthi S, Haque AK, Awasthi YC. 1992. Glutathione S-transferase of human lung: characterization and evaluation of the protective role of the a-class isozymes against lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 299:232-241.

Spies CM, Straub RH, Cutolo M, Buttgerit F. 2014. Circadian rhythms in rheumatology – a glucocorticoid perspective. *Arthritis Res Ther* 16:S3.

Sterling P, Eyer J. 1988. Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. In *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*. S. Fisher i J. Reason, Eds. John Wiley & Sons. New York, 626-649 pp.

Stojiljkovic V, Todorovic A, Kasapovic J, Pejic S, Pajovic SB. 2005. Antioxidant enzyme activity in rat hippocampus after chronic and acute stress exposure. *Ann N Y Acad Sci* 1048:373-376.

Svingen BA, O'Neal FO, Aust SD. 1978. The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation. *Photochem Photobiol* 28:803-809.

Szweda LI, Uchida K, Tasi L, Stadtman ER. 1993. Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. *J Biol Chem* 268:3342-3347.

Šverko V, Sobočanec S, Balog T, Marotti T. 2004. Age and gender differences in antioxidant enzyme activity: potential relationship to liver carcinogenesis in male mice. *Biogerontol* 5:235-242.

Taniyama Y, Griendling KK. 2003. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42:1075-1081.

Turner, RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, Sibonga JD. 2001. Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2:117-127.

Yamakura F, Kawasaki H. 2010. Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 1804:318-25.

Yeo HC, Liu J, Helbock HJ, Ames BN. 1999. Assay of malondialdehyde and other alkanals in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Enzymol* 300:70-78.

Yoshino K, Komura S, Watanabe I et al. 1987. Effect of estrogen on serum and liver lipid peroxide levels in mice. *J Clin Biochem Nutr* 3:233-239.

Townsend DM, Tew KD. 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22:7369-7375.

Tsigos C, Chrousos GP. 2002. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 53:865-871.

Ucar F, Sezer S, Erdogan S, Akyol S, Armutcu F, Akyol O. 2013. The relationship between oxidative stress and nonalcoholic fatty liver disease: Its effects on the development of nonalcoholic steatohepatitis. *Redox Rep* 18:127-133.

Urata Y, Ihara Y, Murata H, Goto S, Koji T, Yodoi J, Inoue S, Kondo T. 2006. 17-Estradiol Protects against Oxidative Stress-induced Cell Death through the Glutathione/Glutaredoxin-dependent Redox Regulation of Akt in Myocardiac H9c2 Cells. *Biol Chem* 281:13092-13102.

Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe´ R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohe´ L. 1995. The diversity of glutathione peroxidases. *Meth Enzymol* 252:38-53.

Valdez SR, Bonafede MM, Carren˜o NB, Deis RP, Jahn GA. 2012. Lactation deficit in OFA hr/hr rats may be caused by differential sensitivity to stress compared with Wistar and Sprague–Dawley rats. *Stress* 15:361-77.

Vale WW, Spiess S, Rivier C, Rivier J. 1981. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213:1394-1397.

Videla LA, Fernandez V, Tapia G, Varela P. 2003. Oxidative stress- mediated hepatotoxicity of iron and cooper: role of kupffer cells. *Biometals* 16:103-111.

Vincent HK, Powers SK, Dirks AJ, Scarpace PJ. 2001. Mechanism for obesity-induced increase in myocardial lipid peroxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:378-88.

Vuković R, Blažetić S, Oršolić I, Heffer M, Vari SG, Gajdoš M, Krivošikova Z, Kramárová P, Kebis A, Has-Schön E. 2014. Impact of ovariectomy, high fat diet, and lifestyle modications on oxidative/antioxidative status in the rat liver. *Croat Med J* 55:218-227.

Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greemberg L, Ravnika V, Sacks FM. 1991. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 325:1196 -1204.

Webb C, Twedt D. 2008. Oxidative Stress and Liver disease. *Vet Clin Small Anim* 38:125-135.

Weisiger RA, Fridovich I. 1973. Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem* 248:3582-92.

Wendel A. 1980. Glutathione peroxidase. In: Jakoby WB, (ed). Enzymatic basis of detoxication. Academic Press, New York. 11:333-353.

Wenger NK, Speroff L, Packard B. 1993. Cardiovascular health and disease in women. *N Engl J Med* 329:247-256.

Wu D, Cederbaum AI. 2009. Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 29:141-154.

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134:489-492.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33:337-349.

Zitka O, Skalickova, Gumulec J, Masarik M, Vojtech A, Hubalek J, Trnkova L, Kruseova J, Eckschlager T, Kizek R. 2012. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett* 4:1247-1253.

Web 1: <http://www.niehs.nih.gov/research/resources/visual-guides/guides/livers/index.cfm>.
Pristup: 28.8.2016